



Universidade de Brasília

Instituto de Química

IGOR PINTO CARVALHO

**Uso do pólen de abelhas nativas brasileiras sem ferrão na
produção da cerveja Catharina Sour**

Brasília – DF

2022

Igor Pinto Carvalho

**Uso do pólen de abelhas nativas brasileiras sem ferrão na
produção da cerveja Catharina Sour**

Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Química como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Química Tecnológica.

Professor Orientador: Doutor, Paulo
Anselmo Ziani Suarez

Brasília – DF

2022

Carvalho, Igor Pinto.

O uso do pólen de abelhas sem ferrão nativas brasileiras para a produção da cerveja Catharina Sour / Igor Pinto Carvalho. – Brasília, 2022.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado) – Universidade de Brasília, Instituto de Química, 2022.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Anselmo Ziani Suarez, Instituto de Química.

1. Catharina Sour. 2. Pólen de abelhas nativas brasileiras sem ferrão. 3. Cerveja.

IGOR PINTO CARVALHO

**Uso do pólen de abelhas nativas brasileiras sem ferrão na
produção da cerveja Catharina Sour**

A Comissão Examinadora, abaixo identificada, aprova o Trabalho de
Conclusão do Curso de Administração da Universidade de Brasília do
aluno

Igor Pinto Carvalho

Prof. Paulo Anselmo Ziani Suárez
Professor-Orientador

Prof^a. Maria Márcia Murta
Professor-Examinador

Prof.^a Grace Ferreira Ghesti
Professor-Examinador

Brasília, 13 de maio de 2022

RESUMO

A cerveja é considerada a bebida mais antiga consumida pelo homem. As fábricas cervejeiras chegaram ao Brasil em 1808 e atualmente o país conta com um grande mercado, entre as quais, as cervejas artesanais têm conquistado seu espaço devido ao seu grande diferencial, caracterizado por um sabor mais encorpado e um aroma mais intenso. A Catharina Sour é uma cerveja artesanal e o único estilo de cerveja genuinamente brasileiro, reconhecido mundialmente pelo seu sabor diferenciado devido a possibilidade de adição de várias frutas em seu preparo. O processo de produção dessa cerveja se diferencia das cervejas tradicionais devido a etapa de acidificação (Kettle Sour) promovido por lactobacilos. O pólen encontrado nas colmeias de abelhas nativas brasileiras sem ferrão possui uma microbiota rica, incluindo microrganismos capazes de realizar a fermentação alcoólica e láctica. O pólen estudado neste trabalho foi o da abelha *Frisiometita varia* (marmelada), sendo encontradas bactérias do gênero *bacillus*, principais microrganismos realizadores de fermentação láctica, e leveduras *zygosaccharomyces*, da mesma família do principal gênero de leveduras usadas na fermentação de bebidas alcoólicas, *Saccharomyces*. A cerveja produzida com o pólen apresentou um tempo menor para a acidificação utilizando uma quantidade significativamente pequena.

Palavras-chave: Pólen. Fermentação. Catharina Sour. Cerveja.

ABSTRACT

Beer is considered the oldest beverage consumed by men. The breweries arrived in Brazil in 1808 and today the country has a large market, amongst which, artisan beers have conquered their space due to its great differential, characterized by a fuller flavor and a more intense aroma. Catharina Sour is an artisan beer and is the only one beer style recognized worldwide for its distinctive flavor due to possibility of adding various fruits in its preparation. The production process of this beer differs from traditional beers due to the acidification step (Kettle Sour) promoted by lactobacilli. The pollen found in the hives of native Brazilian stingless bees has a rich microbiota, including microorganisms capable of carrying out alcoholic and lactic fermentation. The pollen studied in this work was that of the *Frisionelita varia* bee (marmalade), and bacteria of the genus bacillus, the main microorganisms that carry out lactic fermentation, and *zygosaccharomyces* yeasts, from the same family of the main genus of yeasts used in the fermentation of alcoholic beverages, *Saccharomyces*, were found. Beer brewed with pollen had a shorter time to acidification using a significantly small amount.

Key words: Pollen. Fermentation. Catharina Sour. Beer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – O mercado cervejeiro do Brasil em números.....	12
Figura 2 – Crescimento do setor de cervejas artesanais.....	12
Figura 3 – Vias de utilização da glicose.....	18
Figura 4 Etapas da glicólise até a formação do piruvato.....	19
Figura 5 – Esquema da fermentação alcoólica.....	20
Figura 6 – Esquema da fermentação láctica.....	22
Figura 7 - Bioanalyser e chip contendo as amostras aplicadas.....	24
Figura 8 - Árvore filogenética baseada no sequenciamento do rRna 16S das amostras (A) e (B).....	27

Sumário

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO	10
1.2	OBJETIVO GERAL	12
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1	HISTÓRICO DA CERVEJA NO BRASIL	13
2.2	DEFINIÇÃO DE CERVEJA	13
2.3	ESTILOS DE CERVEJA	15
2.4	HISTÓRICO DA CATHARINA SOUR	15
3	REAÇÕES METABÓLICAS	17
3.1	GLICÓLISE	17
3.2	FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA	19
3.3	FERMENTAÇÃO LÁTICA	20
4	METODOLOGIA	22
4.1	CATHARINA SOUR	22
4.2	CROMATOGRAFIA GASOSA COM MASSA ACOPLADA	22
4.3	ANÁLISE DE MICROBIOTA	23
4.4	TITULAÇÃO	24
4.5	PREPARO DA SOLUÇÃO DE NaOH	24
4.6	PREPARO DA SOLUÇÃO DE BIFTALATO DE POTÁSSIO	25
4.7	TEOR DE ACIDEZ	25
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
5.1	ANÁLISE DE MICROBIOTA	26
5.2	CROMATOGRAFIA GASOSA COM MASSA ACOPLADA	28
5.3	TITULAÇÃO	28
5.3.1	Teor de Acidez	29
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS	31

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida conhecida e amplamente consumida no mundo desde os tempos remotos e só vem aumentando a sua popularidade e consumo desde então, resultante da fermentação do mosto, proveniente de malte de cevada e água potável, acrescido de lúpulo. “O nome da cerveja, do latim *cerevisia*, está associado às culturas Italiana (Roma) e Gaulesa (França), como homenagem à deusa da fertilidade e da colheita (cereais), Ceres” (UNIVERSIDADE ABERTA).

“A produção de cerveja tem uma história longa, desde as antigas planícies da Mesopotâmia à atual tendência de produção caseira” (HUGHES, 2013). O processo produtivo sofreu grandes mudanças ao decorrer do tempo, abrindo a possibilidade de utilização de vários ingredientes não tradicionais com o intuito de dar um sabor diferenciado à bebida.

Segundo estudos historiográficos, os pioneiros na produção de cerveja são os povos que habitavam a região denominada Crescente Fértil e formaram as primeiras civilizações, logo após a Revolução do Neolítico, momento em que o homem desenvolve a agricultura, cerca de 7000 a.C. (HUGHES, 2013).

Em 1040 a primeira cervejaria comercial é fundada na abadia de Weihenstephan, na Baviera, onde a produção de cerveja se torna um empreendimento comercial criado pelos monges (HUGHES, 2013). Por toda a Europa, ao longo da Idade Média, a cerveja passa a ser uma das bebidas mais populares. Por ser fervida antes da fermentação, é fonte segura de hidratação numa época em que a água disponível não era confiável.

Com a grande influência da Igreja Católica, a produção da bebida ganha destaque nos mosteiros e abadias e encontra o caminho para a produção em grande escala. Neste período, o lúpulo é introduzido pelos monges nas receitas de cerveja por possuir propriedades de conservação e por dar sabor e aroma característico à bebida. O primeiro registro de cerveja produzida com lúpulo data do ano de 1412 (HUGHES, 2013).

Em 1516 a Lei da Pureza da Cerveja, ou “*Reinheitsgebot*” é criada na Baviera. Essa lei determinava que cevada, lúpulo e água pura são os únicos ingredientes permitidos na fabricação de cerveja. Só se estendeu ao restante da Alemanha em 1906

Em 1710 foi proibido o uso de outros agentes além do lúpulo para dar amargor à cerveja pelo Parlamento na Inglaterra, para garantir retorno pecuniário pela taxaço da planta. Graças a isso o lúpulo se torna o principal ingrediente responsável por essa característica da bebida no mundo ocidental (HUGHES, 2013).

Várias escolas cervejeiras foram surgindo com a popularizaço das bebidas, com destaque para a escola Alemã, Belga, Inglesa e Americana.

As cervejas são classificadas basicamente em dois tipos diferentes, lager e ale, consideradas de baixa fermentaço e de alta fermentaço, respectivamente (REBELLO, 2009). Além de ser caracterizada pelo tipo de cerveja, podemos atestar que existem sobretudo quatro escolas cervejeiras: a Alemã, a Belga, a Inglesa e a Americana, cada uma caracterizada por estilos representativos (BJCP, 2018).

O Brasil ainda não possui uma escola própria, mesmo assim observa-se que a cultura cervejeira no país tem crescido cada vez mais e, juntamente, a vontade em desenvolver uma identidade nacional (FERREIRA, 2016), tentando resgatar a arte dessa bebida milenar, em seu diverso portfólio aromático e suas experiências sensoriais (SEBRAE, 2019). O único estilo de cerveja próprio do Brasil é a Catharina Sour, cerveja mundialmente premiada pelos sabores inusitados capazes de serem introduzidos à bebida.

Este trabalho visa explicar o processo de produço da cerveja Catharina Sour enfatizando o uso do pólen de abelhas nativas brasileiras sem ferrão em seu processo produtivo, comparando com o método tradicional de produço que é utilizando lactobacilos provenientes de leite fermentado com lactobacilos vivos.

1.1 CONTEXTUALIZAÇO

A indústria cervejeira possui grande destaque no mercado nacional, o setor possui mais de 2,7 milhões de pessoas empregadas ao longo da cadeia de produço, ficando entre os maiores empregadores do Brasil. Como possui um importante efeito multiplicador, sua atuação movimenta uma extensa rede que é responsável por 2% do PIB e 14% da indústria de transformaço nacional (CervBrasil, 2018).

“O Brasil já é o terceiro maior produtor de cerveja no mundo, com 13,3 bilhões de litros produzidos, ficando atrás somente da China (46 bilhões de litros produzidos) e Estados Unidos (22,1 bilhões de litros produzidos)” (SINDCERV, 2019). A figura 1 ilustra todas as informações apresentadas:

Figura 1 – O mercado cervejeiro do Brasil em números



Fonte: SINDCERV

Além das grandes cervejarias, o mercado das cervejas artesanais vem ganhando grande força nos últimos anos, “O mercado de cervejas artesanais no Brasil, apesar da crise políticofinanceira, não para de crescer e se mostra como uma aposta promissora para os próximos anos” (FERREIRA, 2016). A figura 2 mostra essa crescente nas vendas das cervejas artesanais nos últimos anos:

Figura 2 - Crescimento do setor de cervejas artesanais



Fonte: Abracerva

Grande parte desse sucesso vem da possibilidade de produção de cervejas com diversos sabores inusitados, como no caso do único estilo de cerveja brasileiro reconhecido mundialmente, Catharina Sour. Este estilo que utiliza em seu preparo frutas, principalmente tropicais, e possui um diferencial das cervejas tradicionais, que é sua acidez, gerada a partir da produção de ácido láctico durante sua preparação.

1.2 OBJETIVO GERAL

Estudar o processo de produção da cerveja Catharina Sour.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizar o pólen da abelha *Frisionelita varia* na produção da cerveja Catharina Sour e comparar os resultados com a cerveja feita com o ingrediente tradicional.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO DA CERVEJA NO BRASIL

No Brasil a cerveja foi trazida por volta de 1808, quando muitos comerciantes estrangeiros se instalaram no Brasil, trazendo-a da Europa, entre muitos outros produtos. Até os anos 70 a cerveja inglesa dominava o Brasil, quando começou a ser produzida a cerveja nacional. No fim do século XX as cervejas importadas voltaram a ganhar espaço, mas desta vez de procedência alemã (SANTOS, 2003). Segundo Hindy (2015), na década de 80 surgiu um movimento chamado A Revolução da Cerveja artesanal, que começou nos Estados Unidos com a aparição das microcervejarias, que trouxeram novamente a qualidade que foi perdida na produção da cerveja massificada. Analogamente, foi criada a “cerveja artesanal” no Brasil. Opondo-se à produção de cerveja industrial, surgem grupos sociais que buscam salvar os valores da produção de cerveja artesanal, levando em conta o consumo pelo prazer e pelo lazer. (GARBIN, 2017).

2.2 DEFINIÇÃO DE CERVEJA

O Regulamento Técnico MERCOSUL de Produtos de Cervejaria (2001) fixa os padrões de identidade e qualidade mínimos que deverão cumprir os produtos de cervejaria. Define-se cerveja como: “Bebida resultante da fermentação, mediante levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou do extrato de malte, submetido previamente a um processo de brassagem, adicionado de lúpulo. O extrato primitivo deve conter um mínimo de 55% em peso de cevada malteada, o restante poderá ser substituído por adjuntos cervejeiros. Ademais, uma cerveja 100% malte ou cerveja puro malte é a cerveja elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém exclusivamente de cevada malteada ou extrato de malte, o que acarreta maior qualidade e valor agregado à cerveja. A cerveja também poderá ser adicionada de corantes, saborizantes e aromatizantes.”

A “Lei da Pureza Alemã” determina que apenas quatro ingredientes podem fazer parte da formulação da bebida, são eles água, cevada, lúpulo e levedura, porém, é um produto que permite várias combinações de outros cereais como o milho, o arroz, o trigo, a aveia, o sorgo, entre outros (MORADO, 2009).

Uma classificação muito importante é o tipo de fermentação, que pode ser:

- Cerveja de alta fermentação – Ale: no processo de fermentação, o líquido é mantido em uma temperatura que fica entre 18 °C e 24 °C, o que resulta em cervejas mais complexas, tanto no paladar quanto no aroma;

- Cerveja de baixa fermentação – Lager: o processo geralmente é mais longo e é mantido a uma temperatura entre 7 °C e 15 °C, influenciando no sabor da cerveja e gerando uma cerveja mais neutra, limpa e leve. (SANTOS, 2014).

Nos dias de hoje, existem basicamente quatro escolas cervejeiras: a Alemã, a Belga, a Inglesa e a Americana, cada uma representada por estilos específicos. A escola alemã tem como característica principal a forte presença do malte e baixa presença do lúpulo, além de respeitarem a Lei da Pureza Alemã e serem em sua maioria de fermentação Lager, ou seja, são cervejas mais leves e menos amargas.

Já a escola belga, ao contrário da alemã, usa da complexidade da fermentação e dos maltes e utiliza de diversas especiarias, criando cervejas mais frutadas, com aromas e sabores marcantes. A escola inglesa, por sua vez, apresenta uma enorme diversidade de estilos, mais amargos que o normal, outras envelhecidas em carvalho, assim como versões favorecendo o uso de maltes torrados.

A última escola é a americana, que está ganhando espaço no mercado com suas versões inovadoras de outras escolas, dos cultivos de lúpulo doméstico, das novas técnicas de produção e por seus estilos extremos, abusando das quantidades de malte e lúpulo (SANTOS, 2014). A fim de facilitar a identificação e classificação destas tão variadas cervejas, existem dois manuais que são conhecidos mundialmente, o Beer Judge Certification Program – BJCP e o Brewers Association – BA. Ambos se baseiam nas principais escolas cervejeiras e consideram características como Aparência, Aroma, Paladar, Flavor, entre outros atributos mais técnicos.

2.3 ESTILOS DE CERVEJA

As cervejas podem ser classificadas por cinco características básicas (Deliberalli, 2015), sendo elas:

- Cor, que pode variar de clara a escura de acordo com a torra do malte;
- Teor alcoólico, que varia com o teor de açúcares fermentescíveis;
- Proporção de malte de cevada e trigo sua composição;
- Teor de extrato primitivo, que é a densidade original do mosto antes de ser fermentado, podendo ser leve, comum, extra e forte;
- Tipo de fermentação, que pode ser espontânea, alta ou baixa.

A maioria das cervejas são claras e de baixa fermentação, ou seja, o malte é menos torrado e quando expostas a temperaturas entre 6 °C a 15 °C, o levedo fica depositado no fundo do tanque, esse estilo é conhecido como “Lager”. O principal tipo de “Lager” é a cerveja Pilsen, consumida mundialmente (AQUARONE et al., 2001; SINDICERV, 2017).

2.4 HISTÓRICO DA CATHARINA SOUR

A Catharina Sour foi o primeiro estilo brasileiro a ser reconhecido internacionalmente. A história do estilo começou em 2016 quando cervejeiros do estado de Santa Catarina decidiram fazer uma bebida com características próximas da Berliner Weisse e adição de frutas. Na época, o experimento foi considerado uma brincadeira entre os produtores, que usavam ingredientes diferentes na fabricação das bebidas artesanais (ANTUÉRPIA, 2020).

Depois de um workshop da Associação Catarinense de Cervejarias Artesanais (ACASC), os produtores decidiram se dedicar mais ao estilo e fortaleceram a presença da Catharina Sour no mercado brasileiro de cervejas artesanais. Foi apenas em 2018 que o estilo foi reconhecido pelo Beer Judge Certification Program (BJCP), organização norte-americana sem fins lucrativos que busca promover o conhecimento cervejeiro e estimular a apreciação de cervejas. O BJCP julga e classifica estilos de cerveja ao redor do mundo e é o maior guia de estilos do

universo cervejeiro. O programa conta com mais de 7 mil juízes em 40 países (ANTUÉRPIA, 2020).

A Catharina Sour é um estilo de cervejas de trigo, produzidas com alta fermentação e acidez láctica com acréscimo de frutas. Possuem amargor moderado, corpo leve, boa carbonatação e um teor alcoólico dentro da média das cervejas, essas características fazem com que o foco principal da cerveja seja o aroma e gosto de frutas.

Uma curiosidade interessante é que o estilo não utiliza necessariamente frutas frescas na sua produção. Por isso, pode-se encontrar rótulos com adição das mais diferentes variações de frutas.

Já a harmonização vai depender do rótulo. Algumas cervejas do estilo combinam mais com comidas gordurosas por causa da acidez, enquanto outras já são mais apreciadas com pratos mais suaves (ANTUÉRPIA, 2020).

A Catharina Sour como qualquer outra cerveja, irá passar pelo processo de fermentação alcoólica. Mas, diferente das outras cervejas, ela também passa por um processo de fermentação láctica denominado kettle sour que irá acidificar o mosto por meio de lactobacilos e a adição de frutas para dar o sabor diferenciado da cerveja.

Com o objetivo de criar uma receita de Catharina utilizando ingredientes encontrados no Brasil, substituindo o uso de leite fermentado com lactobacilos vivos por pólen de abelhas nativas brasileiras sem ferrão para o processo de kettle sour, diferente de qualquer uma encontrada nos mercados e analisar os aspectos como aroma, sabor, acidez e cor comparando com uma Catharina produzida com leite fermentado com lactobacilos vivos.

Segundo estudos do pesquisador da USP e Embrapa Cristiano Menezes (2015), o pólen das abelhas nativas brasileiras sem ferrão possui uma rica microbiota, incluindo bactérias e leveduras. Dois gêneros de bactérias foram identificados em colônias de abelhas sem ferrão. As mais comuns e sempre presentes são do gênero *Bacillus*.

3 REAÇÕES METABÓLICAS

3.1 GLICÓLISE

A fermentação alcoólica é um processo anaeróbico, onde as leveduras buscam energia para as suas atividades metabólicas através da quebra do substrato, carboidrato, produzindo CO_2 e etanol como produtos principais. Os carboidratos que serão degradados pelas leveduras na síntese do etanol, são formados a partir de unidades de glicose. Como a glicose é rica em energia potencial, torna-se um potente combustível para as atividades fisiológicas dos seres vivos. Graças a isso, a “glicose ocupa a posição central no metabolismo de plantas, animais e muitos seres vivos” (NELSON; COX, 2011).

A glicose possui 4 destinos principais na síntese de polissacarídeos complexos: polissacarídeos ou sacarose armazenados nas células; produção de ribose-5-fosfato para a síntese de ácidos nucleicos e NADPH; oxidação a piruvato através da glicólise, produzindo ATP e intermediários metabólicos (NELSON; COX, 2011). A FIG. 3 mostra um esquema simples das quatro vias de utilização da glicose.

Figura 3 – Vias de utilização da glicose

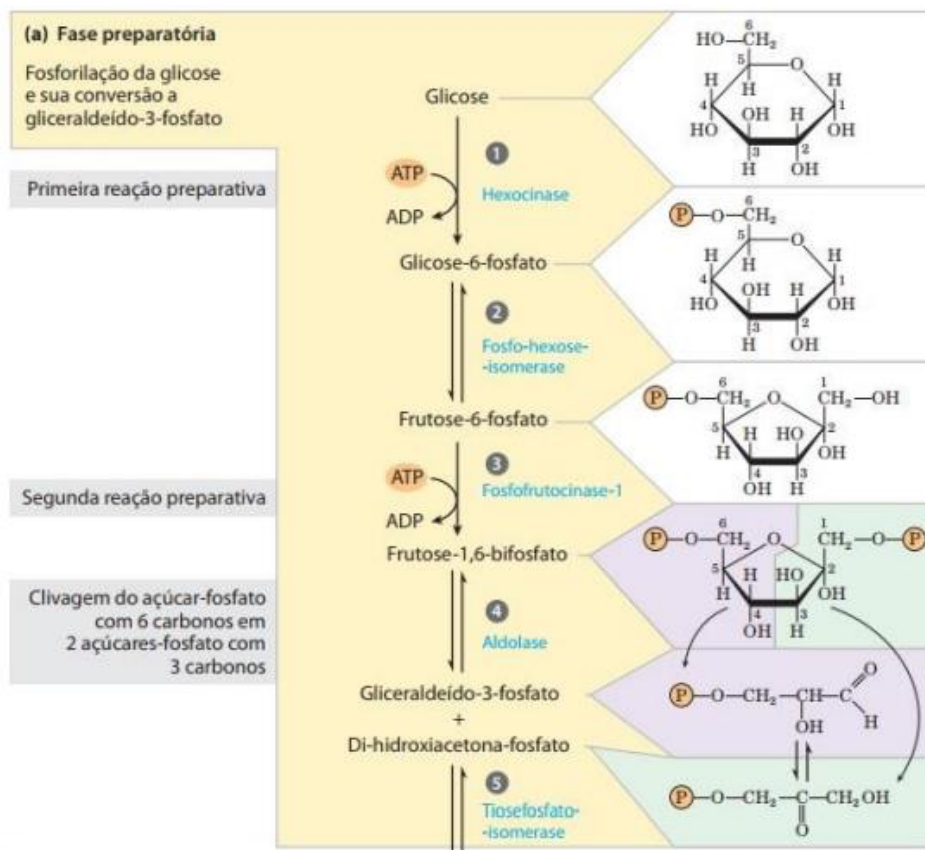


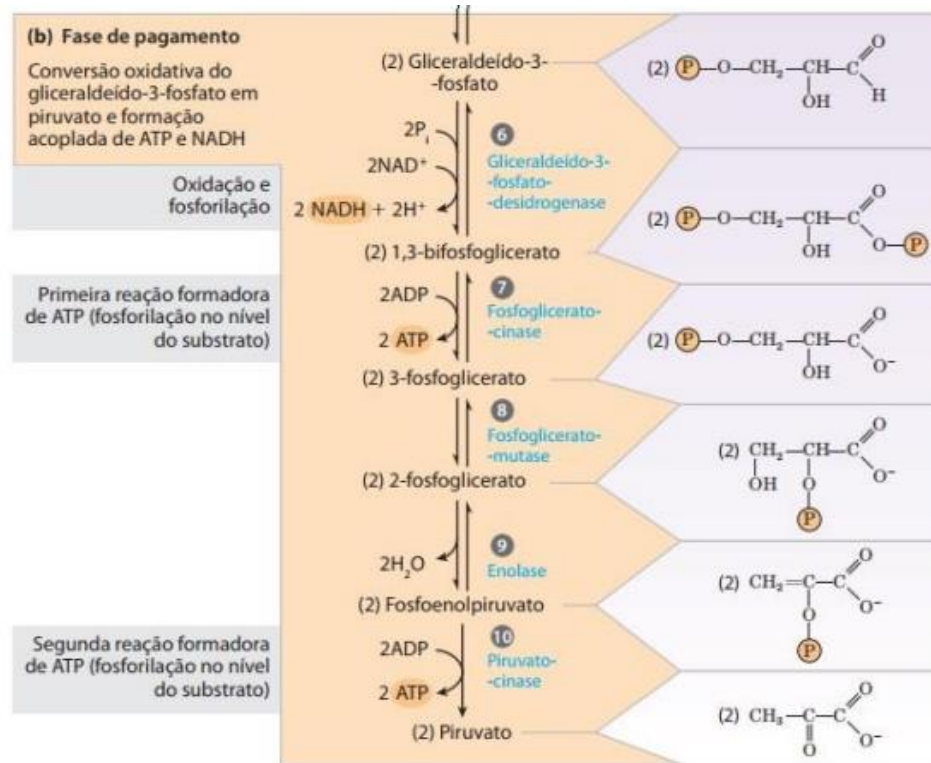
Fonte: NELSON; COX, 2011, p. 527.

A oxidação por glicólise, levando a formação de piruvato, é a responsável pela fermentação alcoólica. A fermentação é precedida por um processo denominado glicólise, que pode ser simplificada expressa como uma reação de quebra de uma molécula de glicose ($C_6H_{12}O_6$), em duas moléculas de piruvato, com a liberação de 4 prótons H^+ .

Uma molécula de glicose é degradada por diversas reações complexas, catalisadas por enzimas, até a formação do piruvato. Esse processo constitui-se em dez etapas, onde as primeiras cinco são as fases preparatórias, onde ocorre o gasto energético, as cinco últimas etapas são denominadas fase de compensação, onde ocorrerá a produção de energia (NELSON; COX, 2011). A FIG. 4 mostra um esquema de todas as reações da glicólise até a formação do piruvato.

Figura 4 – Etapas da glicólise até a formação do piruvato



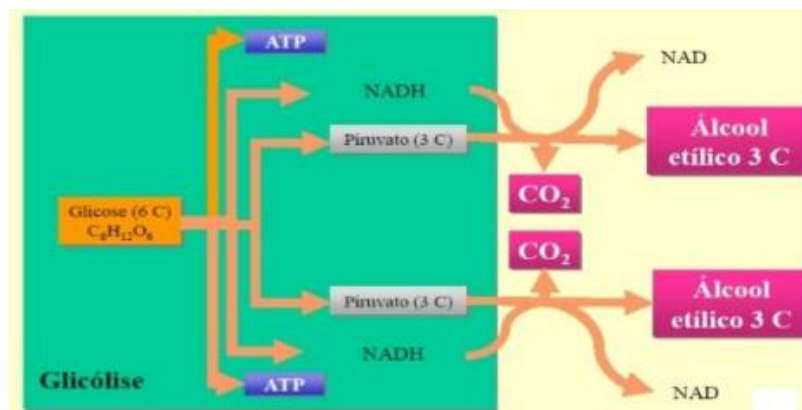


Fonte: NELSON; COX; 2014, p. 545

3.2 FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA

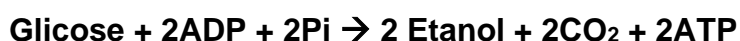
O destino do piruvato formado na glicólise, em condições anaeróbias, é a fermentação. Algumas leveduras e bactérias realizam a fermentação láctica, tendo como produto, o ácido láctico. Já determinadas espécies de leveduras anaeróbias realizam a fermentação alcoólica, onde o produto é o etanol (NELSON; COX, 2011). A FIG. 11 ilustra a fermentação alcoólica.

Figura 5 - Esquema da fermentação alcoólica



Fonte: STEINLE, 2013, p. 9.

Na fermentação alcoólica cada molécula de piruvato será convertida em uma molécula de etanol (C₂H₆O) e outra de gás carbônico (CO₂) e liberará uma molécula de ATP (Trifosfato de Adenosina) (CROCOMO; GUTIERREZ, 2014). Esses dois fenômenos (glicólise + fermentação alcoólica), podem ser representados de forma simplificada pela Equação 1.



O objetivo primordial dos microrganismos, ao metabolizar o açúcar, é produzir ATP. Este exerce o papel de reservatório de energia para a levedura, que será empregado em diversas atividades fisiológicas necessárias a manutenção da vida e perpetuação da espécie (LIMA; BASSO; AMORIM, 2014). As leveduras utilizadas neste processo, na grande maioria, são do gênero *Saccharomyces*. Essas, apresentam ótimo rendimento, cerca de 90%, dispõe de estabilidade quanto ao comportamento fisiológico, não exigem condições de processos complexas, entre outras características (STEINLE, 2013).

3.3 FERMENTAÇÃO LÁTICA

Um dos métodos mais antigos de transformação/conservação de alimentos utilizados pelo homem é a fermentação (HANSEN, 2002 apud SANTA, 2008), e diversas matérias-primas diferentes podem servir de substrato para sua ocorrência.

Com o avanço da ciência, os processos de fermentação foram sendo aprimorados e diversificados para as mais variadas finalidades, e existem tipos diferentes de fermentação que utilizam substratos diferentes e geram produtos diferentes.

O processo de fermentação ocorre a partir da transformação da Glicose (C₆H₁₂O₆) em ácido láctico através da ação majoritária de lactobacilos, bactérias capazes de realizar a conversão de derivados da lactose em ácido láctico.

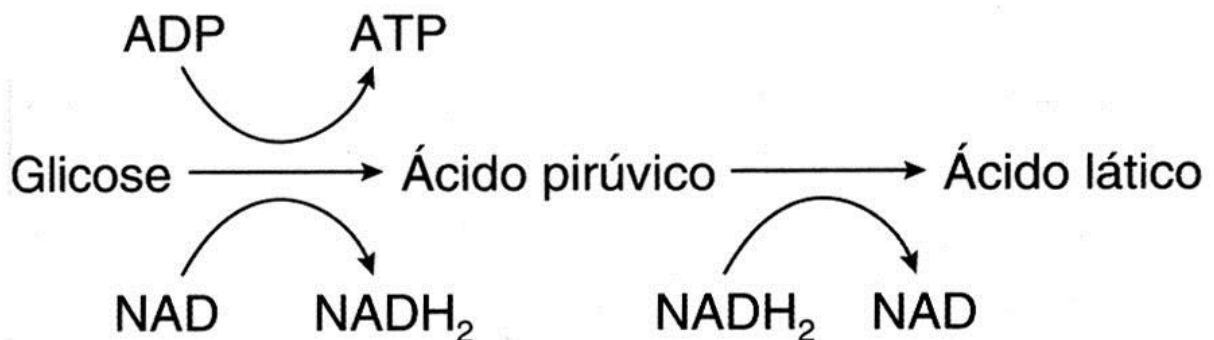
Os lactobacilos são capazes de sobreviver tanto em ambientes aeróbicos como em ambientes anaeróbios, e sua atuação na formação de ácido láctico causa a degradação parcial da matéria orgânica de um substrato e a utilização da energia liberada através de reações químicas para produção de ATP.

De forma geral, a equação da fermentação láctica pode ser descrita pela Equação 2:



Durante a fermentação láctica ocorre o processo de glicólise com derivados da lactose. O NAD⁺ (dinucleotídeo nicotinamida e adenina) atua como agente oxidante da molécula de glicose e é reduzido em NADH, que será absorvido pelo piruvato distribuído pelo citosol e convertido, no caso da fermentação láctica, em lactato. Tem-se a formação de ácido pirúvico através da cessão de elétrons do NADH diretamente para o piruvato, ATP (adenosina trifosfato) e NADH₂. A energia liberada durante os processos de conversão da glicose é utilizada para a produção de duas novas moléculas de ATP.

Figura 6 - Esquema da fermentação láctica



BLOG DO PROF. DJALMA SANTOS. Testes de respiração aeróbica e de fermentação. Recife, 08 ago. 2013. Disponível em: <https://djalmasantos.wordpress.com/2013/08/08/testes-de-respiracao-aerobica-e-de-fermentacao/>. Acesso em: 02 nov. 2022.

4 METODOLOGIA

4.1 CATHARINA SOUR

Para produzir a Catharina Sour foram utilizados 3 Kg de malte Pilsen, 3 Kg de malte de Trigo, 1kg de maracujá, 1kg de manga, 3 frascos de 40g de Yakult para o método tradicional e 15g de pólen da abelha *Frisiometita varia* para a Catharina a ser analisada.

Para começar a produção, 19 litros de água foram aquecidos até 45°C e o malte foi adicionado, essa mistura de água e malte é o mosto. Após a adição, o mosto foi aquecido em uma rampa de temperatura ficando 10 minutos em 52°C, 20 minutos em 63°C, 20 minutos em 71°C e 10 minutos em 78°C. A próxima etapa foi a lavagem do mosto, onde os grãos serão separados da solução e será feita a adição de mais 19 litros de água para completar os 30 litros de cerveja, grande parte da água adicionada no início da produção foi evaporada ou absorvida pelo malte.

Os 30 litros separados foram fervidos por 10 minutos para eliminar odores e sabores indesejados para a cerveja. Depois de fervido, o mosto foi resfriado até atingir a temperatura de 45°C para a adição dos lactobacilos (Yakult) ou pólen, mantido nessa temperatura por 36 horas ou até o pH atingir o valor de 3,5.

Após o pH atingir o valor de 3,5, as frutas foram adicionadas ao mosto e foi iniciada a última etapa do processo de produção, que será ferver o mosto por 70 minutos e adicionar 15g do lúpulo Magnum nos últimos 30 minutos da fervura. Após finalizado o tempo de fervura, a cerveja foi transferida para o fermentador, onde foi utilizado o fermento US-06 para a fermentação durante 1 semana.

4.2 CROMATOGRAFIA GASOSA COM MASSA ACOPLADA

As amostras de mosto fermentado foram levadas ao laboratório para serem analisadas no GC MS para determinar os produtos formados. A curva de temperatura

utilizada foi 60 °C até 110 °C, variando a temperatura em 10 °C s⁻¹, mantendo a temperatura final por 5 min. A temperatura do injetor e do detector foi de 250 °C.

4.3 ANÁLISE DE MICROBIOTA

A análise de microbiota foi feita com o Bioanalyser Agilent 2100, que consiste em um equipamento que faz análise de RNA encontrado na amostra, fazendo uma comparação de similaridade com o banco de dados mundial.

O pólen foi dividido em três amostras: (A) extração de RNA total de amostras de pólen; (B) seleção de bactérias utilizando meio de cultura Luria Bertani (LB); (C) seleção de possíveis leveduras com meio YPD (extrato de levedura 1%, peptona 2% e dextrose 2%).

As amostras (B) e (C) foram incubadas por 16 h a 30 °C e 200 rpm antes do processo de extração. A extração de RNA total foi feita com reagentes TRIzol (Thermo Fisher Scientific) e RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN) de acordo com as recomendações e especificações dos fornecedores.

A quantificação de RNA total foi feita de acordo com as recomendações do QUBIT, método fluorimétrico específico para RNA, com maior precisão em relação ao método espectrofotométrico tradicional, por utilizar corantes específicos para RNA, DNA e proteínas.

Para analisar a integridade do RNA, foi realizado eletroforese capilar das amostras, através do sistema Agilent 2100 Bioanalyser, (Agilent Technologies, protocolo padrão para RNA). A qualidade do RNA foi verificada pelo RNA Integrity Number – RIN. A FIG. 7 Mostra o Bioanalyser.

Figura 7 - Bioanalyser e chip contendo as amostras aplicadas.



4.4 TITULAÇÃO

Para medir o teor de acidez das amostras e fazer as devidas comparações, foram realizadas titulações com NaOH em triplicada para cada uma das amostras. Para isso, foram preparadas soluções de NaOH e uma solução de Biftalato de Potássio para a padronização.

4.5 PREPARO DA SOLUÇÃO DE NaOH

A concentração desejada para a solução de NaOH era de 0,1 mol/L, para isso foram utilizados 2,022g de NaOH diluídos em 0,5L de água.

4.6 PREPARO DA SOLUÇÃO DE BIFTALATO DE POTÁSSIO

Para a padronização, a concentração da solução de biftalato deve ser próxima a da solução de NaOH, pois a reação entre as duas é da ordem de 1:1, tendo isso em vista, o objetivo foi preparar uma solução de biftalato com concentração próxima de 0,1mol/L, para isso foram utilizados 4,7g de biftalato sólido diluídos em 0,2L de água, resultando em uma solução com concentração igual a 0,1151mol/L.

4.7 TEOR DE ACIDEZ

Para calcular o teor de acidez foi utilizado a equação a abaixo:

Equação 1: Cálculo do teor de acidez

$$\text{Acidez total (\%ácido láctico)} = \frac{(V(\text{mL}) \times M_{\text{real}}(\text{mol/L}) \times MM(\text{g/L}) \times 100)}{(m(\text{g}) \times 1000)} = \%$$

Onde:

V= volume em mL da solução de NaOH usado nas titulações;

M_{real}= molaridade NaOH encontrada na média (0,1061 mol/L);

MM= massa molar do ácido láctico (90.08 g/mol)

m= massa da cerveja.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DE MICROBIOTA

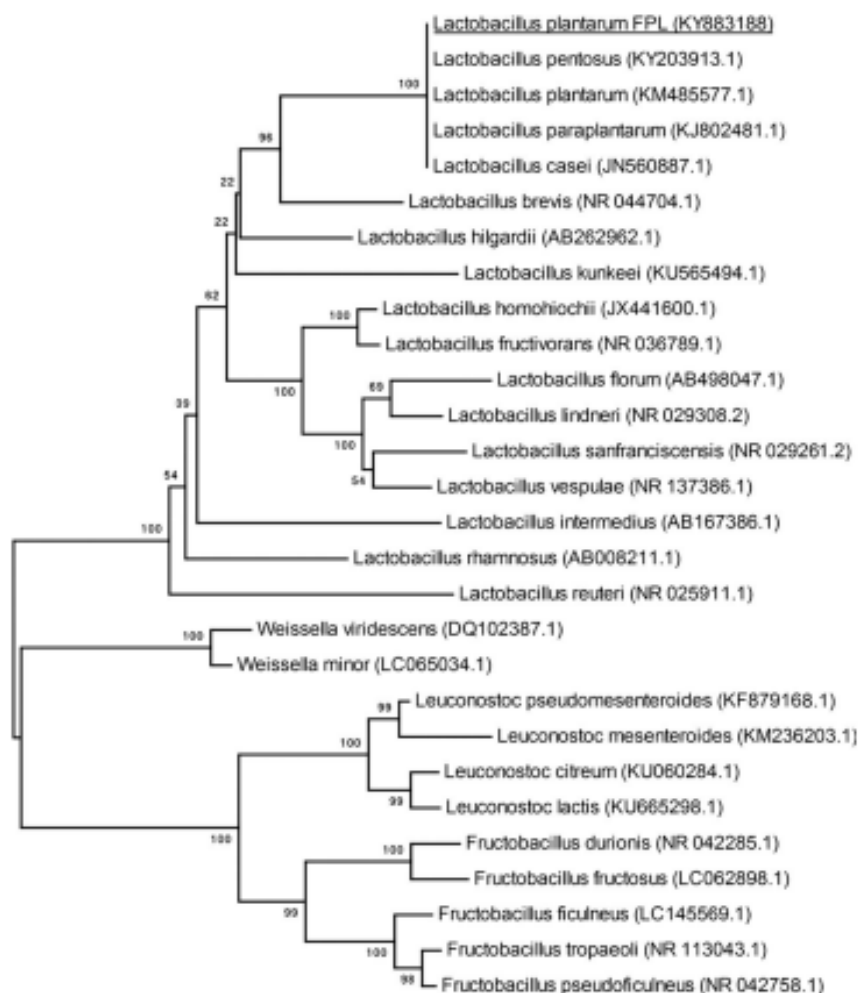
A concentração de RNA obtida nas amostras avaliadas foi de 600 ng/ μ L para a amostra (B) e 180 ng/ μ L para a amostra (C). O Bioanalyzer permitiu uma análise qualitativa e quantitativa de cada amostra de RNA. O parâmetro mensurado foi o RNA Integrity Number – RIN, o de maior importância para o sequenciamento.

A quantidade de RNA presente nas amostras é de elevada importância para a realização do sequenciamento, pois só as amostras com uma concentração de RNA igual ou superior a 40 ng/MI são viáveis.

O valor de RIN foi calculado por um algoritmo que analisa os resultados obtidos e atribui uma pontuação às amostras, que varia de 1 a 10. Para amostras de procariotos e eucariotos, o valor de RIN igual ou superior a 7 é considerado ótimo e as amostras são aprovadas para análises posteriores. Somente 2 amostras (A) e (B) tiveram RIN acima de 7.

Análises preliminares de sequenciamento de Sanger apontam a presença de bactérias ácido-láticas frutofílicas (FLAB), especialmente *Fructobacillus* e *Lactobacillus*. A FIG 8 mostra os resultados no Bioanalyser.

Figura 8 – Árvore filogenética baseada no sequenciamento do rRna 16S das amostras (A) e (B).



Fonte: Resultados Bioanalyser.

Não foi possível obter os resultados para o teste de leveduras pois a amostra © degradou durante o processo. Os resultados obtidos corroboram os resultados das pesquisas feitas por Cristiano Menezes, pesquisador da Embrapa e USP, que mostram a presença de bactérias do gênero *bacillus* e leveduras do gênero *zygosaccharomyces*, da mesma família das leveduras usadas para a fermentação alcoólica (*27accharomyces*), no pólen de abelhas sem ferrão nativas brasileiras (disponível em: abelha.org.br).

5.2 CROMATOGRAFIA GASOSA COM MASSA ACOPLADA

As amostras dos diferentes mostos fermentados foram analisadas por GC-MS. No mosto fermentado por fermento comercial foi observado apenas a presença de etanol. Já nos mostos fermentados com pólen foi possível observar a formação de ácido láctico e etanol, sugerindo que houve fermentação láctica e alcoólica. Este resultado provavelmente é consequência da presença de lactobacilos, como evidenciado na análise de microbiota feita com o Bioanalyser.

A partir desses resultados ficou evidente que o pólen da abelha Marmelada mostrou-se pouco eficaz para a fermentação alcoólica, mas um excelente insumo para a fermentação láctica. O pólen foi, então, usado para a produção de cerveja no estilo *Catharina Sour*, que em seu preparo, requer o uso de lactobacilos para a acidificação do mosto até um pH de 3,5, num processo chamado de *Kettle Sour*. O pólen apresentou uma velocidade superior ao método convencional (adição de Yakult ao mosto) para atingir o pH 3,5.

5.3 TITULAÇÃO

As titulações foram feitas em triplicata e o para cada amostra de cerveja e o volume de cerveja utilizado para o branco foi igual a 15mL. Os volumes necessários da solução de NaOH para cada replicata das amostras de *Catharina Sour* tradicional e da *Catharina Sour* com pólen estão apresentados na tabela abaixo:

Tabela 1 – Volume de NaOH utilizado para a titulação das 2 amostras de cerveja

Volume de NaOH					
		Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média
Catharina Sour tradicional		13,5mL	13,5mL	13,8mL	13,6mL
Catharina Sour com pólen		15,2mL	15,3mL	15,4mL	15,3mL

Para a padronização foram utilizados 10ml da solução de biftalato e 9ml da solução de NaOH para a virada, como a reação é de 1:1, fazendo uma regra de 3 simples a concentração real da solução de NaOH foi obtida. Concentração real da solução de NaOH: 0,107mol/L.

5.3.1 Teor de Acidez

Densidade das duas cervejas: 1.005 g/mL, como foram usados 15 mL nas duas, temos massa das duas cervejas de 15,075 g. Para a Catharina Sour tradicional o teor de acidez encontrado foi de 8,6% enquanto que a Catharina Sour com pólen obteve um valor de 9,7%.

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que o mercado de cervejas artesanais está em alta no Brasil, possuindo diversas possibilidades para o preparo das mais variadas cervejas. O pólen de *Friseomelita varia* foi extremamente eficiente na fermentação láctica, mostrando ser uma opção mais do que viável para acelerar o processo de kettle sour, usando apenas 15 g de pólen a velocidade de acidificação muito superior quando comparada com o método convencional (3 Yakults, 120 g), produzindo uma cerveja com uma suavização maior dos sabores, ou seja, o pólen da abelha Marmelada é um excelente insumo para a fermentação láctica, possibilitando a produção de uma Catharina Sour com ingredientes nativos do cerrado.

REFERÊNCIAS

BJCP. **Catharina Sour**. 2018. Disponível em: <https://dev.bjcp.org/beer-styles/x4-catharinasour/>. Acesso em: 23 out. 2022.

BLOG DO PROF. DJALMA SANTOS. **Testes de respiração aeróbica e de fermentação**. Recife, 08 ago. 2013. Disponível em: <https://djalmasantos.wordpress.com/2013/08/08/testes-de-respiracao-aerobica-e-de-fermentacao/>. Acesso em: 02 nov. 2022.

FERREIRA, Gabriela da Silva. **ANÁLISE DA ESTRUTURA DE MERCADO DA CERVEJA: A competitividade e estratégias de mercado da indústria cervejeira do Brasil e microcervejarias**. 2016. 56 f. Monografia (Especialização) - Curso de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Glicólise. **Bioquímica ilustrada**, 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A, 2012. cap. 8, p. 89-108.

http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/mercado-cervejeiro/, acessado em 26/07/2022.

<https://abelha.org.br/abelhas-sem-ferrao-e-microrganismos-parte-1/>, acessado em 28/04/2022.

<https://abracerva.com.br/>, acessado em 07/05/2022.

<https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/>, acessado em 12/05/2022.

HUGHES, GREG. **Cerveja feita em casa**. São Paulo: Publifolha, 2013. 14 p.

MENEZES, CRISTIANO. **Abelhas - Fermentação**. Disponível em: <<https://www.ecodebate.com.br/2021/06/25/abelhas-sem-ferrao-usam-microrganismos-para-preservar-o-mel-e-para-se-alimentar/>>

NELSON, D. L.; COX, M. M. Glicólise, Gliconeogênese e Via das Pentoses-Fosfato. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., 2011. cap. 14,

NELSON, D. L.; COX, M. M. Glicólise, Gliconeogênese e Via das Pentoses-Fosfato. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 6. ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A., 2014. cap. 14,

REBELLO, Flávia de Floriani Pozza. Produção de cerveja. **Revista Agrogeoambiental**, Minas Gerais, v. 1, n. 3, p. 224-240, 1 dez. 2009. IFSULDEMINAS (Instituto Federal do Sul de Minas). <http://dx.doi.org/10.18406/2316-1817v1n32009224>.

SEBRAE. **Microcervejarias no Brasil**. 2019. Disponível em: http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/ARQUIVOS_CHRONUS/bds/bds.nsf/8818d2

SOOMRO, H. A., Masud, T., Anwaar, K.. **Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health**. Pakistan Journal of Nutrition, v.1, n.1, p. 20- 24, 2002.

STEINLE, L. A. **Fatores que interferem na fermentação alcoólica**. 2013. 51 p. Dissertação (Pós-Graduação em Gestão do Setor Sucroenergético – MTA)- Universidade Federal de São Carlos, Sertãozinho, 2013.

VIANA, FERNANDO LUIZ E. **Indústria de bebidas alcoólicas**. Caderno setorial ETENE, 2020.