UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

LEONARDO MOREIRA MENEZES

EFEITO DO MILHO E DO DEGRAU PROTEOLÍTICO NO PREPARO DO MOSTO CERVEJEIRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rio de Janeiro
2018

LEONARDO MOREIRA MENEZES

EFEITO DO MILHO E DO DEGRAU PROTEOLÍTICO NO PREPARO DO MOSTO CERVEJEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, da Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (Engenharia).

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Flavia Camporese Sérvulo

Co-orientador: Prof. Dr. Thiago Rocha dos Santos Mathias

Rio de Janeiro
2018

CIP - Catalogação na Publicação

M541e

MOREIRA MENEZES, LEONARDO
EFEITO DO MILHO E DO DEGRAU PROTEOLÍTICO NO PREPARO DO MOSTO CERVEJEIRO / LEONARDO MOREIRA MENEZES. -- Rio de Janeiro, 2018.
72 f.

Orientador: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.
Coorientador: Thiago Rocha dos Santos Mathias.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2018.

1. Mosturação. 2. Degrau proteolítico. 3. Adjuntos cervejeiros. 4. Processo cervejeiro. I. Camporese Sérvulo, Eliana Flávia, orient. II. Rocha dos Santos Mathias, Thiago, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

LEONARDO MOREIRA MENEZES

EFEITO DO MILHO E DO DEGRAU PROTEOLÍTICO NO PREPARO DO MOSTO CERVEJEIRO

Dissertação de mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (Engenharia).

Aprovada em 03/05/2018

_____

Orientadora: Dra. Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc. – EQ/UFRJ

_____

Co - orientador: Dr Thiago Rocha dos Santos Mathias - IFRJ

_____

Dra. Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc – EQ/UFRJ

_____

Dra. Sorelle Fiaux de Medeiros - UFF

_____

Dra. Verônica Ferreira Melo - IFRJ

Rio de Janeiro
2018

“A percepção do desconhecido é a mais fascinante das experiências. O homem que não tem os olhos abertos para o misterioso passará pela vida sem ver nada.”

(Albert Einstein)

RESUMO

MENEZES, Leonardo Moreira. **Efeito do milho e do degrau proteolítico no preparo do mosto cervejeiro**. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Escola de Química/UFRJ

A substituição parcial de malte de cevada tem sido uma das alternativas principais da indústria cervejeira, de grande e pequeno porte, para a redução dos custos de produção uma vez que o mercado nacional de cevada não supre a demanda, sendo, portanto, necessária sua importação. O milho é a matéria-prima normalmente utilizada por ser abundante no nosso território, baixo custo e fácil acessibilidade. Outra estratégia econômica adotada por grandes cervejarias é a exclusão do degrau proteolítico na etapa de mostura, o que concorre para redução do tempo de processo, bem como contribui na redução dos gastos energéticos. O objetivo deste trabalho foi comparar aspectos físico-químicos de mostos cervejeiros, doces e amargos, preparados seguindo planejamento experimental, adotando como variáveis independentes a adição ou não de adjunto amiláceo (milho) na etapa de mosturação e o degrau proteolítico. A introdução de adjunto e a não realização de degrau proteolítico prejudicou a cor final do mosto deixando-o mais claro, reduziu os teores de compostos fenólicos, nitrogênio e proteína bruta, bem como da atividade antioxidante. Por outro lado, a ação das proteases no mosto resultou em maior liberação de açúcares redutores totais, escurecimento da cor do mosto, e maiores teores de nitrogênio e fenólicos totais. Os resultados indicam que o emprego do adjunto e a não passagem pelo degrau proteolítico apesar de ser uma alternativa para redução de custo do processo, em contrapartida, implicará em mosto pobre nos aspectos sensoriais e nutricionais, e, portanto, comprometerá a atividade da levedura durante o processo fermentativo.

Palavras-chaves: adjuntos cervejeiros, mostura, degrau proteolítico.

ABSTRACT

MENEZES, Leonardo Moreira. **Effect of corn and proteolytic step in the preparation of beer wort**. Rio de Janeiro, 2018. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Escola de Química/UFRJ

The partial substitution of barley malt has been one of the main alternatives of the brewing industry, for the reduction of the costs of production since the national market of barley does not supply the demand, being therefore necessary its importation. Corn is the raw material normally used for being abundant in our territory, low cost and easy accessibility. Another economic strategy adopted by breweries is the exclusion of the proteolytic step in the brewing stage, which contributes to the reduction of process time, as well as contributes to the reduction of energy expenditure. The objective of this work was to compare the physical and chemical aspects of brewer's musts, sweet and bitter, prepared following experimental planning, adopting as independent variables the addition or not of amylaceous adjunct (corn) in the stage of mash conversion and the proteolytic step. The introduction of adjunct and the non-performance of a proteolytic step impaired the final color of the wort, making it clearer, reducing phenolic compounds, nitrogen and crude protein, as well as antioxidant activity. On the other hand, the action of the proteases in the wort resulted in greater release of total reducing sugars, darkening of the color of the wort, and higher levels of total nitrogen and phenolics. The results indicate that the use of the adjunct and the non-passage through the proteolytic step, despite being an alternative to reduce the cost of the process, in contrast, will imply poor must in the sensorial and nutritional aspects, and, therefore, will compromise the activity of the yeast during the fermentative process.

Keywords: brewer's adjuncts, mash, proteolytic step.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CONSUMO DE CERVEJA EM L/ANO (PER CAPITA), 2014. 18
FIGURA 2 - PROCESSO CERVEJEIRO INDUSTRIAL. 26
FIGURA 3 - MALTE TIPO PILSEN. 33
FIGURA 4 - LÚPULO EM *PELLETS*. 34
FIGURA 5 – APARATO UTILIZADO NA ETAPA DE MOSTURA. 35
FIGURA 6 - CURVA DE MOSTURA COM DEGRAU PROTEOLÍTICO. 35
FIGURA 7 - CURVA DE MOSTURA SEM DEGRAU PROTEOLÍTICO. 36
FIGURA 8 - PANELA DE FUNDO FALSO UTILIZADA NA CLARIFICAÇÃO. 38
FIGURA 9 - PROCESSO DE COCÇÃO. 39
FIGURA 10 - FILTRAÇÃO DO MOSTO AMARGO. 39
FIGURA 11 - ESCALA DE CORES DE CERVEJA (EBC). 41
FIGURA 12 - MICROPLACAS PARA LEITURA DAS ABSORBÂNCIAS DAS AMOSTRAS EM REAÇÃO COM ÁCIDO GÁLICO. 42
FIGURA 13 - DESTILADOR POR ARRASTE À VAPOR 43

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PARÂMETROS E CARACTERÍSTICAS DAS CERVEJAS (BRASIL, 2001). 16
QUADRO 2 - CARACTERÍSTICAS DOS ADJUNTOS AÇUCARADOS UTILIZADOS PELA INDÚSTRIA CERVEJEIRA 23
QUADRO 3 - COMPOSIÇÃO DOS GRÃOS E GRITS DE MILHO 23
QUADRO 4 **- CARACTERÍSTICA DE LEVEDURA *LAGER* E *ALE*** 24
QUADRO 5 - ESTATÍSTICA T STUDENT PARA COR DO MOSTO: C1/C3(AMOSTRA MOSTO DOCE SEM DEGRAU PROTEOLÍTICO) 65
QUADRO 6 - ESTATÍSTICA T STUDENT PARA COR DO MOSTO: C2/C4(AMOSTRA MOSTO DOCE COM DEGRAU PROTEOLÍTICO) 65
QUADRO 7 - ESTATÍSITCA T STUDENT PARA COR DO MOSTO: C1/C3(AMOSTRA MOSTO AMARGO SEM DEGRAU PROTEOLÍTICO). 65
QUADRO 8 - ESTATÍSITCA T STUDENT PARA COR DO MOSTO: C2/C4(AMOSTRA MOSTO AMARGO COM DEGRAU PROTEOLÍTICO). 65
QUADRO 9 - ESTATÍSTICA T STUDENT PARA AÇÚCARES REDUTORES (DNS) - C1/C3(AMOSTRA MOSTO DOCE SEM DEGRAU PROTEOLÍTICO) 66
QUADRO 10 – ESTATÍSTICA T STUDENT PARA AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS C2/C4(AMOSTRA MOSTO DOCE COM DEGRAU PROTEOLÍTICO). T CRÍTICO<STAT T, HÁ DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS (H0REJEITADA) 66
QUADRO 11 – ESTATÍSTICA T STUDENT PARA AÇÚCARES REDUTORES TOTAIS C1-C3/C2-C4(AMOSTRA MOSTO DOCE). T CRÍTICO<STAT T, HÁ DIFERENÇA ENTRE AS MÉDIAS (H0REJEITADA) 66

Quadro 12 - Estatística t student para açúcares redutores totais C1-C3/C2-C4(amostra mosto amargo). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada) 66
Quadro 13 – Estatística t student para fenólicos totais C1/C3 (amostra mosto doce). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada) 67
Quadro 14 - Estatística t student para fenólicos totais C2/C4(amostra mosto doce com degrau proteolítico). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada)....67
Quadro 15 - Estatística t student para fenólicos - C1/C3(amostra mosto amargo sem degrau proteolítico)....67
Quadro 16 - Estatística t student para fenólicos totais C2/C4(amostra mosto amargo com degrau proteolítico). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada)....68
Quadro 17 - Estatística t student para nitrogênio total C1/C3 (amostra mosto doce). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada) 68
Quadro 18 - Estatística t student para nitrogênio total C2/C4(amostra mosto doce com degrau proteolítico). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada)....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas da cevada e malte de cevada....19
Tabela 2 - Composição centesimal média de lúpulos comerciais 21
Tabela 3 - Temperatura ótima de atuação de diferentes enzimas....26
Tabela 4- Especificação do malte Pilsen Agrária 33
Tabela 5 - Características do floco de milho 33
Tabela 6 - Planejamento experimental para produção dos mostos cervejeiros .35
Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão do extrato (°Plato) 45
Tabela 8 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito - Extrato 45
Tabela 9 - Valores médios e desvio padrão da acidez nos mostos....46
Tabela 10 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito - Acidez 47
Tabela 11 – Valores médios e desvio padrão da cor do mosto....47
Tabela 12 – Resultados da análise estatística de tamanho de efeito - cor 48
Tabela 13 - Valores médios e desvio padrão para ART 49
Tabela 14 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito - ART 49
Tabela 15 - Valores médios e desvio padrão para fenólicos totais 51
Tabela 16 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito - Fenólicos 51
Tabela 17 - Valores médios e desvio padrão para nitrogênio total....53
Tabela 18 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito - Nitrogênio 53
Tabela 19 - Atividade antioxidante (%) de amostras de mosto amargo 55
Tabela 20 - Atividade antioxidante (IC50) de amostras de mosto amargo 55

SUMÁRIO

1. Introdução 12
2.1. Cerveja 15
2.1.1. Definição 15
2.1.2. Histórico e mercado.....17
2.1.3. Matérias-primas cervejeiras 18
2.1.3.1. Água 18
2.1.3.2. Malte.....19
2.1.3.3. Lúpulo.....20
2.1.3.4. Adjuntos 21
2.1.3.4.1. Milho: Composição/Processamento 23
2.1.4. Agentes de fermentação 24
2.1.5. Processo cervejeiro 25
2.1.5.1. Moagem 26
2.1.5.2. Brassagem 26
2.1.5.3. Resfriamento e aeração 29
2.1.5.4. Fermentação 29
2.1.5.5. Fermentação secundária/ maturação 30
2.1.5.6. Carbonatação.....30
2.1.5.7. Pasteurização.....30
2.1.5.8. Envase 31
3. Objetivos 31
3.1. Objetivos específicos 31
4. Materiais e métodos 32
4.1. Matérias-primas.....32
4.1.1. Água 32
4.1.2. Malte.....32
4.1.3. Flocos de milho 33
4.1.4. Lúpulo.....34
4.2. Produção dos mostos cervejeiros 34
4.2.1 Moagem do malte.....35

4.2.2. Mostura 35
4.2.3. Clarificação.....38
4.2.4. Cocção 38
4.3. Determinações analíticas 40
4.3.1. Extrato (°P).....40
4.3.2 Cor.....40
4.3.3. Determinação de acidez titulável e do pH 41
4.3.4. Determinação de açúcares redutores totais (ART) pelo método DNS 41
4.3.5. Determinação de compostos fenólicos totais 41
4.3.6. Determinação da atividade antioxidante através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo).....42
4.3.7. Determinação do teor de nitrogênio 43
4.3.8. Análises estatísticas.....43
4.3.8.1. Tamanho de efeito.....43
4.3.8.2. Teste t de *student*.....44
5. Resultados e discussão.....44
5.1. Parâmetros físico-químicos.....45
5.2. Resultados de ART, fenólicos totais, nitrogênio total e atividade antioxidante...49
5.2.1 Açúcares redutores totais.....49
5.3. Teor de compostos fenólicos totais 51
5.4. Avaliação do teor de nitrogênio total 53
5.5. Avaliação da atividade antioxidante 55
6. Conclusões.....57
7. Sugestão para trabalhos futuros 57
8. Referências bibliográficas. 58
ANEXO 1.....64
APÊNDICE A – ANáLISE ESTATÍSTICA *t* de student 64
5.6.1. Cor do mosto (EBC) 65
5.6.2. Açúcares redutores totais.....66
5.6.3. Fenólicos totais 67
5.6.4. Nitrogênio total 68
APÊNDICE B – CURVAS PADRÃO DAS ANÁLISES QUÍMICAS 69
APÊNDICE C – FÓRMULAS PARA CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO.....71

1. INTRODUÇÃO

O mercado brasileiro de cerveja é o mais importante da América do Sul e um dos maiores do mundo, posicionado em terceiro lugar no *ranking* mundial, atrás da China e dos Estados Unidos (BRASIL, 2005; DATAMARK 2017). Criado em 1853, o setor cervejeiro está presente em grande parte do território nacional, abrangendo desde o agronegócio até o pequeno varejo (CERVBRASIL, 2014). Segundo dados fornecidos pelo Sistema Brasileiro de Produção de Bebidas (SICOBE), da Receita Federal, o mercado nacional de cerveja registrou retração entre 1 e 2,7% a partir de 2015, por conta da queda no consumo e aumento dos preços devidos ao aumento das cargas tributárias.

A estabilidade econômica do mercado depende, dentre outros fatores, de fornecer produtos de qualidade a preços acessíveis. No caso do setor cervejeiro, uma estratégia tecnológica para a redução de custos de produção pode ser a substituição do malte de cevada por adjuntos, fontes complementares de carboidratos, bem mais baratos do que o malte (HOUGH, 1985). É importante ressaltar que a maior parte do malte utilizado no Brasil é importada e tem um alto custo (DIAS, 2018). No Brasil, como ocorre em outros países, a utilização de adjuntos na fabricação de cervejas é permitida por lei (VENTURINI FILHO, 2000).

Segundo a lei n° 8.918, de 14/07/1994 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o malte pode ser substituído por adjuntos cervejeiros, podendo ser utilizados cereais malteados ou não, assim como açúcares de origem vegetal. Se o adjunto for uma fonte de cereal, a legislação permite que até 45% do malte seja substituído, enquanto para adjuntos de origem vegetal, que não seja de cereal, o limite é de 10% (DIAS, 2018).

A introdução de carboidratos alternativos para elaboração do mosto cervejeiro, além de contribuir para redução de custo do produto final (cerveja), permite corrigir propriedades que não foram atingidas durante o processo, como por exemplo, teor de extrato e cor. Entretanto, o emprego de adjuntos não deve interferir na qualidade da cerveja (CURI, 2009). Em geral as grandes cervejarias nacionais utilizam o milho na substituição parcial do malte de cevada, particularmente para produção da cerveja *American Lager* (CARVALHO, 2007). De acordo com Priest e Stewart (2006), extrato contendo 30% de grits de milho produz um aroma similar ao obtido

em cervejas de puro malte. Por outro lado, o baixo teor de proteínas no milho comparativamente ao malte resulta em uma cerveja com baixo corpo (textura) e baixa estabilidade de espuma, muito relacionado à quantidade de proteínas de alta massa molecular.

Outra estratégia para a redução dos custos de produção e dos tempos de processo é a redução dos tempos de mostura. Nesta etapa, as matérias-primas (malte e adjunto) são misturadas em água e sofrem aquecimentos sucessivos, onde permanecem por certos períodos, de modo a favorecer a hidrólise do amido e proteínas pelas enzimas presentes no malte. Desta etapa resulta o mosto doce, isto é, uma mistura líquida isenta de amido e rica em açúcares fermentescíveis, além de fontes nitrogenadas.

Dentre as alternativas, a supressão do degrau proteolítico é comumente praticada pelas grandes cervejarias. Esta etapa corresponde ao primeiro aquecimento da etapa de mostura, na faixa de temperatura de 45 a 55°C, com tempo de repouso de 20 minutos, para favorecimento da atividade de enzimas proteolíticas presentes no malte, levando a hidrolise de proteínas e polipeptídios constituintes do malte em frações menores. Dado isto, não realizar o degrau proteolítico leva a obtenção de mostos com baixo teor de compostos nitrogenados e, por conseguinte, com baixa disponibilidade de fontes de nitrogênio para adequada atividade metabólica das leveduras na etapa de fermentação.

De modo geral, a condução da mostura afeta significativamente a qualidade da cerveja a ser produzida gerando efeitos negativos e positivos relacionados à adição do milho e da supressão do degrau proteolítico (BRIGGS *et al*, 2004). Dentre os efeitos gerados; sabores indesejados são formados devido à falta de suplementação nitrogenada na etapa de fermentação alcoólica gerando produtos e subprodutos de fermentação; A cor final da cerveja também está relacionada ao teor de aminoácidos presente no mosto que são resultado da hidrólise de proteínas presentes no malte (aminoácidos e açúcares redutores que participam de reações de *Maillard*, formando cor na etapa de cocção). No entanto, quando na etapa de mostura, opta-se pela supressão do degrau proteolítico e utilização de um adjunto amiláceo com baixo teor proteico, um efeito positivo relacionado à cor da cerveja é evidenciado devido à inexistência de reações de *Maillard*, resultando em uma cerveja mais clara e

cristalina, característica intrínseca das cervejas tipo *Pilsen*. Entretanto, quando do emprego de adjunto de baixo teor proteico, como no caso do milho, a supressão do degrau proteolítico pode influenciar positivamente no corpo e estabilidade da espuma de cerveja, na qual está relacionado à quantidade de proteínas de médio e alto peso molecular. Assim sendo, a baixa atividade proteolítica contribuirá para um aumento do teor de proteínas de médio e alto peso molecular, favorecendo o corpo e na estabilidade de espuma (BAMFORTH, 2003). Para tanto, é necessário avaliar analiticamente os mosto produzidos determinando parâmetro relevante para o processo cervejeiro bem como extrato original, cor, pH, açúcar redutor, fenólicos e nitrogênio total.

Muito se tem discutido sobre práticas de uma boa alimentação. Por exemplo, algumas substâncias naturalmente presentes no grão de cevada são reconhecidamente benéficas à saúde humana (IDEHEN *et al*, 2017). Os principais fitoquímicos são ácidos fenólicos, flavonoides, lignanas, vitamina E (tocóis), esteróis e folatos. Compostos fenólicos fornecem funções essenciais na reprodução e crescimento, atuam como mecanismos de defesa contra patógenos e parasitas (LATTANZIO *et al*, 2006). Esteróis e tocóis são principalmente componentes de óleos vegetais que fornecem benefícios como proteção contra toxinas, doenças neurológicas como a doença de Alzheimer e diabetes (BARTLOMIEJ, JSTYNA, 2012). Portanto, o consumo de cerveja, em dose equilibrada, apresenta efeito benéfico. Além do mais, o etanol tem efeito positivo no metabolismo HDL, e apresenta papel importante na absorção destes compostos fenólicos, contribuindo para uma favorável atividade antioxidante, além de desempenharem um papel importante nas características sensoriais da bebida bem como, cor, aroma e sabor da cerveja. (GHISELLI *et al*, 2000).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cerveja

2.1.1. Definição

O decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a lei n° 8.918, de 14/07/1994 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), define cerveja como:

> "a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, oriundo do malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo".

Comumente, a depender da legislação de cada país, parte do malte de cevada pode ser substituído por outras fontes de carboidratos, denominadas adjuntos. No Brasil, a legislação permite substituição em até 45% por adjuntos que podem ser outros cereais (milho, trigo, centeio, aveia, cevada, aveia, e a maioria dos integrais, em flocos ou somente a parte amilácea) ou açúcares de origem vegetal (BRASIL, 1997).

Ainda segundo a legislação brasileira, em sua Instrução Normativa 54, de 5 de novembro de 2001 do MAPA (BRASIL, 2001), a cerveja pode ser classificada como mostra o Quadro 1.

Quadro 1 - Parâmetros e características das cervejas (Brasil, 2001).

Parâmetros	Características
Quanto ao extrato primitivo	
Cerveja leve	Extrato primitivo maior ou igual a 5% e menor que 10,5%
Cerveja comum	Extrato primitivo maior ou igual a 10,5% e menor que 12,5%
Cerveja extra	Extrato primitivo maior ou igual a 12% e menor que 14%
Cerveja extra forte	Extrato primitivo maior que 14%
Quanto à cor	
Cerveja clara	Abaixo de 20 unidades EBC
Cerveja escura	Acima de 20 unidades EBC
Quanto ao teor alcoólico	
Cerveja sem álcool	<0,5% de álcool, não sendo obrigatório declarar no rótulo o teor alcoólico.
Cerveja com álcool	>0,5% de álcool, sendo obrigatório declarar no rótulo o teor alcoólico.
Quanto à proporção de malte de cevada	
Cerveja puro malte	100% de malte de cevada como fonte de açúcar.
Cerveja	≥55% de malte de cevada como fonte de açúcar.
Cerveja com o nome do vegetal predominante	>20 e <55% de malte de cevada como fonte de açúcar.
Quanto à fermentação	
Baixa fermentação	Processo de fermentação que utiliza leveduras ativas em temperaturas baixas (9 a 15°C) com fermentação mais lenta e maior produção de aromas.
Alta fermentação	Processo de fermentação que utiliza leveduras a temperaturas mais elevadas (15 a 25ºC) com aromas mais típicos frutados e, por vezes, condimentados.

2.1.2. Histórico e mercado

De modo geral, é bem aceito que a primeira cerveja foi fabricada pelos sumérios (Oriente Médio) há cerca de 5500 anos. Entretanto, há registros de que os egípcios já tinham conhecimentos da arte cervejeira e fabricavam alguns tipos de cerveja, como a ‘cerveja dos Notáveis’ e a ‘cerveja de Tebas’, que eram preparadas a partir da mistura de água, pão semi cozido, malte de cevada e suco de tâmaras ou tamarindos. Depois, a mistura era fermentada em recipientes de madeira de acácia. Já os sumérios obtinham uma massa com grãos moídos que, após o cozimento, se tornava o que hoje é conhecido como pão. Com o passar do tempo, a massa fermentava, transformando-se em bebida alcoólica com aspecto de “pão-líquido”. É esta a bebida que traz características que mais se assemelham, ainda que distante, com a atual cerveja. Na Alemanha, o documento mais antigo que registra a arte da produção cervejeira é datado de 800 a.C., imputada a monges (VENTURINI FILHO, 2001).

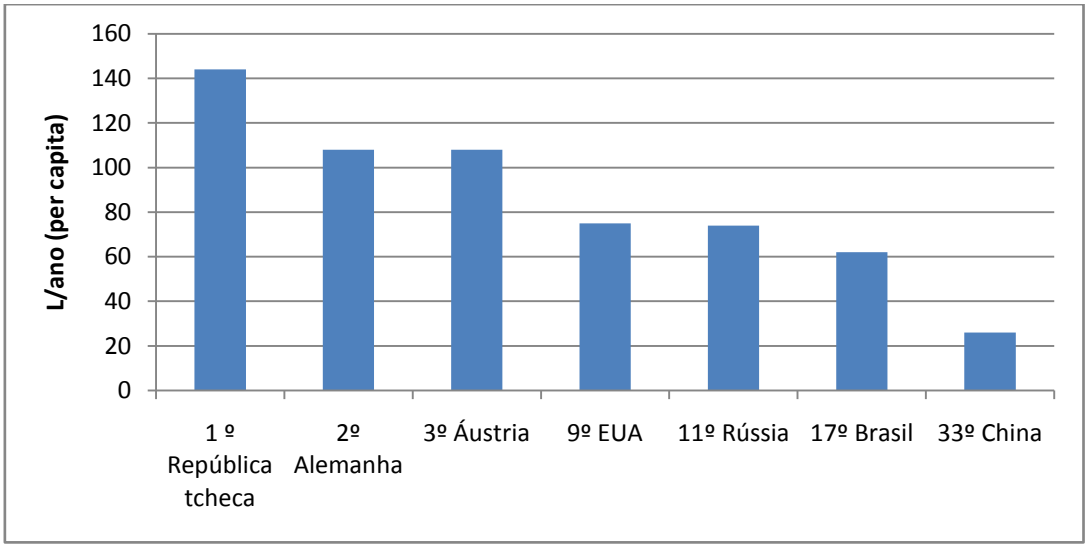
No Brasil, a cerveja foi introduzida pela família real portuguesa, após a transferência da Corte Portuguesa para o então Brasil Colônia, com ampliação da venda a partir de 1808. Posteriormente, com a abertura dos portos às nações amigas de Portugal, a cerveja passou a ser comercializada exclusivamente pela Inglaterra. Contudo, a primeira fábrica oficial de cervejas, denominada Cervejaria Brasileira, foi criada em 1836, no Rio de Janeiro (MORADO, 2011).

O setor cervejeiro é um dos setores mais tradicionais no Brasil e está presente em grande parte do território nacional (CervBrasil). Em 2017, o Brasil chegou à marca de 610 estabelecimentos produtores de cervejas, incluindo desde as pequenas até as cervejarias de grande porte, segundo um levantamento do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), publicado na primeira semana de 2018. O levantamento mostra a tendência de expansão deste mercado, com aumento expressivo do número de rótulos. O total de registros de cervejarias, cervejas e chopes, em 2017, foi de 8.903 produtos.

Segundo a Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil), mesmo ocupando a posição de terceiro maior produtor de cerveja do mundo, atrás apenas da China e dos Estados Unidos, e tendo a cerveja como a bebida alcoólica mais

consumida no país, o Brasil encontra-se tão somente na 17ª posição mundial no *ranking* de consumo de litros por ano (*per capita),* totalizando 62 litros consumidos por pessoa, em 2014 (SEBRAE, 2014). A Figura 1 apresenta o consumo *per capita* no ano de 2014 para vários países.

Figura 1 - Consumo de cerveja em L/ano (per capita), 2014.



2.1.3. Matérias-primas cervejeiras

2.1.3.1. Água

Na fabricação da cerveja, grande quantidade de água é necessária, e distinguem-se dois tipos de água: (i) água cervejeira, que é usada no preparo do mosto e etapas afins, bem como na lavagem de garrafas, latas e barris; e (ii) água de serviço, aquela empregada em procedimentos, locais e equipamentos que não entram em contato com o produto. Portanto, a escolha do local de implantação da indústria cervejeira é definida pela facilidade de captação de uma fonte abundante de água.

A matéria prima utilizada em maior quantidade na produção da cerveja é a água cervejeira, pois representa cerca de 90% da composição do produto. Esta, após captada, deve passar por uma etapa de tratamento adequado para o processo cervejeiro (CARVALHO, 2007), pois tem grande influência na qualidade da cerveja produzida (VENTURINI FILHO, 2000; DRAGONE *et al.*, 2007; FARIA, 2008;

ZUPPARDO, 2010). Assim, a água cervejeira deve ser necessariamente potável, isenta de cloro livre, incolor, inodora e livre de nitratos, metais pesados.

2.1.3.2. Malte

No processo cervejeiro, o malte é oriundo do processo artificial de germinação (malteação) da cevada (*Hordeum vulgare L. var. distichum*), em condições controladas de temperatura, umidade e aeração (ALMEIDA; SILVA, 2005).

A cevada, cereal da família das gramíneas, é o cereal contemplado por ser única em reunir características importantes para o fabrico da cerveja, tais como: é rica em amido, contém as enzimas adequadas, possui casca que confere proteção ao grão durante a malteação e dá o aroma e sabor característicos do produto (ZUPPARDO, 2010). O grão de cevada deve apresentar tamanho uniforme e cor clara, além de estar livre de manchas escuras e regiões descoloridas, normalmente devidas ao ataque de micro-organismos, o que pode conferir sabor e odor desagradável à cerveja. A Tabela 1 apresenta algumas características físico-químicas da cevada e do malte de cevada.

É importante entender que o malte de cevada é uma mistura de grãos com diferentes propriedades, como, por exemplo, dimensões, espessuras e comprimentos, que diferem entre si para cada grão. Desta maneira, é importante uma classificação dos grãos para que na moagem dos mesmos, etapa responsável pela exposição das frações internas do grão, não haja comprometimento da qualidade da cerveja (BRIGGS *et al.,*2004*)*.

Tabela 1 - Características físico-químicas da cevada e malte de cevada.

Característica	Cevada	Malte
Massa do grão (mg)	32-36	29-33
Umidade (%)	10—14	4-6
Amido (%)	55-60	50-55
Nitrogênio total (%)	1,8-2,3	1,8-2,3
N solúvel / N total (%)	10-12	35-50
Poder diastásico (ºLintner)[1]	50-60	100-250
α-amilase (DU)	Traços	30-60

FONTE: Adaptado de Kunze (1996).

[1] °**Lintner** é a unidade de medida usual para medir o poder do grão de malte de cevada em converter amido em açúcar redutor (poder diastásico).

Malteação

A malteação é a etapa responsável pela transformação da cevada crua em biomassa rica em poder enzimático (BAMFORTH, 1993). O processo de malteação é dividido em três etapas. A primeira etapa, denominada maceração, consiste no encharcamento dos grãos de cevada, com com temperatura e aeração adequadas, induzindo ao crescimento. O embrião libera um hormônio vegetal, a giberelina, ativando a camada de aleurona e produzindo várias enzimas e promovendo a germinação do grão, que é a segunda etapa. É nesta etapa que ocorre o aumento do poder diastásico do grão. Por fim, o processo de germinação é interrompido pela terceira etapa, a secagem do malte (VENTURINI FILHO, 2000; SILVA; FARIA, 2008; BOLTON, 2006).

2.1.3.3. Lúpulo

O cultivo de lúpulo (*Humulus lupulus* L.), pertencente à família Cannabacea, é particularmente direcionado para a indústria cervejeira, que utiliza aproximadamente 97% do que é cultivado (ALMAGUER *et al*, 2014). Trata-se de uma planta trepadeira, perene e dióica, ou seja, apresenta flores femininas e masculinas em indivíduos diferentes, típica de países de clima frio, e com idade econômica de cultivo entre 20 e 30 anos (RODRIGUES, 2015). Como a produtividade está relacionada ao período de inverno prolongado, seu cultivo normalmente ocorre nos Estados Unidos, Austrália, Japão, alguns países da Europa e da América do Sul (RODRIGUES, 2015). Em 2016, 98% das importações brasileiras de lúpulo vieram da Alemanha (55%) e dos Estados Unidos (43%), conforme aponta Berber (2017).

As inflorescências femininas do lúpulo são reconhecidamente ricas em substâncias ativas responsáveis pelo amargor e aroma característicos da cerveja, correspondendo a 25% ou mais da massa seca do lúpulo (KEUKELEIRE, 1999). Dentre elas, a lupulina (órgão reprodutor da planta), onde estão as substâncias de interesse cervejeiro, como óleos e resinas amargas, responsáveis pelo amargor e aroma da bebida (CEREDA, 1983; TSCHOPE, 2001).

As substâncias mais importantes estão presentes na fração de resinas chamadas resinas moles, a saber: α-ácidos (humulonas), que apresentam efeito acentuado no amargor da bebida, e β-ácidos (lupulonas), importantes para o aroma,

porém pouco influenciam no sabor amargo (HOUGH, 1985), posto que são ácidos fracos e de baixa solubilidade em água (KEUKELEIRE, 1999). O aroma é, sobretudo, devido à composição dos óleos essenciais rica em terpenos fenólicos e polifenóis.

Há uma gama enorme de variedades de lúpulos para fabricação de cerveja. As variedades mais recentes têm ganhado força por serem mais resistentes às doenças, por apresentarem maior rendimento de isomerização de seus componentes de interesse, e por possuírem melhor qualidade (PRIEST *et al*, 2006). As proporções relativas dos constituintes individuais dependem fortemente da variedade de lúpulo e, para uma dada variedade, das condições de crescimento (BIENDL *et al*, 2014). A Tabela 2 apresenta a composição centesimal média de alguns lúpulos comerciais.

Tabela 2 - Composição centesimal média de lúpulos comerciais.

Constituintes	**Concentração (%m/m)**
Água	10,0
Resinas totais	15,0
Óleos essenciais	0,5
Taninos	4,0
Monossacarídeos	2,0
Pectina	2,0
Aminoácidos	0,1
Proteína bruta	15,0
Lipídeos e ceras	3,0
Cinzas	8,0
Celulose, lignina, etc	40,4
Total	100,0

FONTE: Hough (1985).

Os ácidos do lúpulo têm, ainda, pronunciada atividade bacteriostática, inibindo, sobretudo o crescimento de bactérias Gram-positivas (HAAS *et al*, 2014).

2.1.3.4. Adjuntos

A Lei da Pureza Alemã, ou *Reinheitsgebot*, promulgada em 1516, na Baviera, pelo Duque Guilherme IV, define por adjunto “tudo o que não é malte,

fermento, lúpulo ou água" (SANTOS, 2004). No entanto, uma definição mais específica contextualiza adjuntos como fontes de carboidratos em substituição parcial ao malte de cevada na fabricação da cerveja, com pouca ou nenhuma atividade enzimática, porém podem conferir características especiais à cerveja (BRASIL, 2009).

Os adjuntos amiláceos são os carboidratos mais utilizados pelas indústrias cervejeiras. É possível utilizar qualquer fonte de amido como adjunto, malteado ou não, desde que observada a disponibilidade, o valor econômico e o teor de amido disponibilizado (D'AVILA *et al*, 2012).

A cerveja brasileira do tipo *American Lager*, mais popularmente conhecida como cerveja *Pilsen*, utiliza adjuntos como milho ou arroz em sua composição. No entanto, para a produção de cervejas mais sofisticadas se faz necessário a utilização de cereais como trigo, centeio e aveia, observa Sleiman e colaboradores (2010). Níveis altos de milho na formulação de mosto cervejeiro acarretam alterações no aspecto sensorial da cerveja. Ao introduzir quantidades extremas deste adjunto, altos níveis de diacetil e maiores teores de álcoois superiores são identificados. No entanto, durante o processo de maturação do sabor, os níveis de diacetil diminuem com formação de ésteres, predominantemente acetato de etila e acetato de amila. Já os níveis de álcoois superiores praticamente não se modificam (CARVALHO, 2007).

Cervejas produzidas com cereais não malteados apresentam menores teores de nitrogênio, o que implica em perda de estabilidade da espuma. Porém, maiores valores para estabilidade da espuma foram encontrados em cervejas formuladas com malte e cevada em comparação daquelas elaboradas apenas com malte, provavelmente por ocorrência de menor nível de proteólise durante o preparo do mosto (CURI, 2009), já que o conteúdo enzimático (incluindo proteases) é fornecido pelo cereal malteado.

Outra possibilidade é o emprego de adjuntos açucarados como, por exemplo, xarope de maltose. Substituir milho e arroz por xarope de maltose simplifica o processo, uma vez que o xarope não necessita passar por etapa de sacarificação, que será descrita adiante, o que contribui para redução do tempo de processo

(MELKINOV, 2007). Além disso, permite obter cervejas mais uniformes quanto à coloração, teor alcoólico, corpo e sabor (REINOLD, 1997).

De um modo geral, a utilização de adjuntos como fonte suplementar de carboidratos é oportuna, pois estes levam à minimização de custos do processo. Ademais, conferem diversos efeitos sobre a qualidade do mosto produzido e sobre a cerveja obtida, principalmente no que diz respeito aos compostos nitrogenados presentes (PRIEST *et* al, 2006). Os adjuntos, por serem ricos em açúcares e pobre nos demais componentes, em geral, melhora a estabilidade coloidal da cerveja, reduzindo a sua turvação (POLLOCK, 1979). É, também, responsável por conferir à cerveja cor mais clara, corpo mais leve, sabor e aroma mais suave, uma vez que, com seu uso, ocorre redução das concentrações de extrato do malte (HOUGH, 1985; VENTURINI FILHO, 2000). O Quadro 2 apresenta as características de alguns adjuntos utilizados na produção cervejeira.

Quadro 2 - características dos adjuntos açucarados utilizados pela indústria cervejeira.

Tipos	Nitrogênio Total (%) m/m	Cor solução 10% m/v (EBC)	Fermentabilidade (%)	Densidade específica (20°C)
Tipos de açúcares				
Xarope de açúcar refinado de cana	0,01	3	≥95	1,33
Açúcar líquido invertido	0,01	3 – 12	≥95	1,43
Xarope cervejeiro de amido de milho hidrolisado	0,02	Cor baixa (deve ajustar)	77-78	1,42
Extrato de malte	0,65 - 1,3	4	70	1,40

FONTE: Adaptado de Briggs *et al*, (2004)

Segundo Bradee (1977), entretanto, quando há excesso na utilização de adjunto, este pode acarretar problemas quanto à qualidade sensorial e nutricional da cerveja, como por exemplo: mosto com baixo teor de nitrogênio, influenciando no metabolismo da levedura; mosto com elevada viscosidade, prejudicando a etapa de filtração; diluição excessiva da cerveja, influenciando diretamente na cor e na formação da espuma no produto final.

2.1.3.4.1. Milho: Composição/Processamento

Os grãos de milho são os adjuntos mais utilizados no Brasil. Em um estudo para avaliar a porcentagem total de adjunto utilizado na formulação do mosto

cervejeiro, feito por Sleiman e colaboradores (2010), com 161 amostras de cervejas do tipo *Pilsen* em dezessete estados brasileiros, através da análise isotópica do carbono, concluiu-se que em torno de 95% das cervejas foram produzidas utilizando adjuntos na formulação do mosto cervejeiro e, majoritariamente, o milho foi o adjunto empregado. Das amostras analisadas, 3,7% das cervejas obtiveram percentual de malte abaixo do mínimo exigido pela legislação em sua formulação.

O g*rits* de milho, o qual é utilizado para produção de cerveja, é um subproduto da indústria de óleo de milho. Neste caso, o grão é basicamente separado, por moagem seca, em gérmen, pericarpo e endosperma. A retirada do gérmen, muito rico em lipídeos, para produção de óleo traz benefícios sensoriais para a cerveja quanto à estabilidade da espuma, dentre outros (GONÇALVES et al, 2003). O Quadro 3 apresenta as características do grão de milho integral e do *grits* de milho.

Quadro 3 - Composição dos grãos e grits de milho.

Componente	**Grão de milho (%)**	***Grits* de milho (%)**
Água	13	< 13
Proteínas	9,8	8-9
Lipídeos	4,6	< 1
Amido	63	90

FONTE**:** Reinold (1997).

2.1.4. Agentes de fermentação

O emprego de leveduras do gênero *Saccharomyces* em processos fermentativos é bem conhecido, tanto na área de alimentos quanto na área química, como a panificação e a produção de etanol. O metabolismo fermentativo das *Saccharomyces* resulta na formação de etanol e dióxido de carbono a partir de mono e dissacarídeos disponibilizados (BRIGGS *et al*, 2004).

No processo cervejeiro, duas espécies de leveduras são comumente utilizadas, *S. cerevisiae* e *S. uvarum*. Dentre as espécies citadas, *S. cerevisiae* é classificada como levedura de alta fermentação (*Ale*), pois, dentre diversas características, pode-se destacar que o CO_2 produzido faz com que os aglomerados celulares flotem durante a fermentação. Já as *S. uvarum* têm maior tendência à

sedimentação, uma vez que sua atividade é menos intensa e há liberação de CO_2 mais controladamente, sendo denominadas por isso leveduras de baixa fermentação (*Lager*).

Além do diferenciado comportamento durante a fermentação, as espécies também apresentam diferentes valores ótimos de temperatura para atividade fermentativa, em torno de 20°C para as leveduras de alta fermentação e na faixa de 6 a 15°C para as de baixa fermentação (TSCHOPE, 2001). Há, ainda, grande diferença no perfil de subprodutos formados, com forte impacto sensorial sobre a bebida final.

Classificações mais recentes indicam que estas duas leveduras são, na verdade, da mesma espécie (*S. cerevisiae*), e apenas cepas diferentes. Chamadas, então, de levedura *S. cerevisiae* tipo alta fermentação ou tipo baixa fermentação (OLIVEIRA, 2011).

O Quadro 4 apresenta as diferenças entre as leveduras do tipo *Ale e Lager.*

Quadro 4 - Característica de levedura *Lager* e *Ale.*

Características	**Estirpe *Lager***	**Estirpe *Ale***
Tipo de fermentação	Baixa	Alta
Floculação	Boa	Menos eficiente
Temperatura de fermentação	Abaixo de 15ºC	Acima de 15ºC
Máximo temperatura de crescimento	32-34ºC	38-40ºC
Utilização de maltotriose	Mais completa	Menos eficiente
Volatilização de composto sulfurosos	Mais	Menos

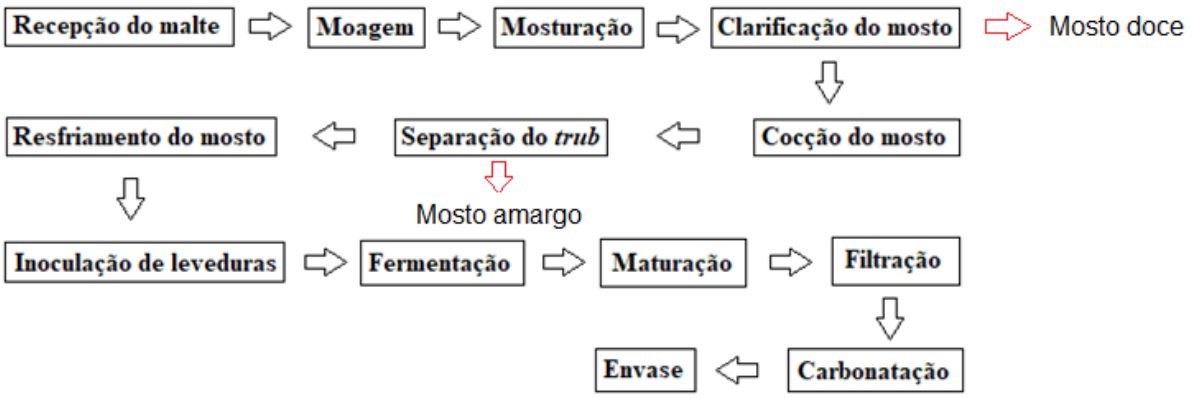
FONTE: TSCHOPE (2001).

2.1.5. Processo cervejeiro

A produção de cerveja é um exemplo típico da biotecnologia industrial. Apesar das inúmeras variações na condução, dependendo do tipo da cerveja a ser produzida, o processo se resume basicamente nas seguintes etapas: produção do mosto cervejeiro, a partir da hidrólise dos componentes insolúveis do malte; fermentação primária e secundária; e processamento final/maturação. Dentre as

etapas, a mais importante é a fermentação, na qual as células de levedura fermentam o mosto cervejeiro, transformando-o em cerveja. O processo básico de uma indústria cervejeira é apresentado na Figura 2.

Figura 2 - Processo cervejeiro industrial.



2.1.5.1. Moagem

A moagem do malte é a etapa inicial de grande importância para as transformações físico-químicas do grão, aumentando os rendimentos da extração de açúcares e outros compostos de interesse, na etapa seguinte, de preparo do mosto. Apresenta, ainda, importância na filtração do mosto, visto serem as cascas do cereal utilizadas como leito filtrante, devendo permanecer da forma mais íntegra quanto possível. Já o endosperma, deve ser cominuído, de forma a expor as frações amiláceas e de outras macromoléculas e facilitar a atuação das enzimas hidrolíticas (TSCHOPE, 2001).

2.1.5.2. Brassagem

Esta etapa do processo cervejeiro tem por objetivo o preparo do mosto e pode ser subdividida em três etapas, as quais: mostura, clarificação e cocção.

a) Mostura

Nesta etapa, também denominada mosturação, ocorre a transformação dos cereais utilizados como matéria prima. O objetivo é recuperar a maior quantidade possível de extrato no mosto, a partir do malte ou da mistura de malte e adjunto (VENTURINI FILHO, 2000). Para tanto, os grãos de malte e adjunto moídos são

misturados em água, seguido do ajuste do pH e controle de temperatura. São utilizadas múltiplas rampas de temperatura de acordo com um programa previamente estabelecido, de modo a favorecer a atividade das enzimas presentes no malte e, portanto, promover a hidrólise do amido e outras macromoléculas de interesse (CEREDA, 1983; REINOLD, 1997).

Para que a hidrólise do amido ocorra, é preciso uma etapa prévia de gelatinização, com o objetivo de favorecer a exposição da macromolécula à atuação das enzimas, que geralmente são fornecidas pelo malte de cevada (PERPETE; COLLIN, 2000). A gelatinização é o processo pelo qual há transformação do amido granular em pasta viscoelástica (JANG, 1996). Durante o aquecimento do amido na presença de água, inicialmente ocorre o encharcamento de seus grânulos até temperaturas nas quais ocorre o rompimento da estrutura, com destruição da ordem molecular e mudanças irreversíveis nas suas propriedades. A temperatura na qual ocorre este tipo de transformação é chamada de temperatura de gelatinização do amido, que para o milho é de aproximadamente 62ºC. Por ser superior à temperatura de gelatinização do amido do malte de cevada, há necessidade de pré-aquecimento antes da adição do cereal (D'AVILA *et al*, 2012).

A escolha do tipo de programa de temperatura e tempo a ser utilizado deve considerar a composição e o tipo de cerveja desejados, com base na quantidade de açúcares fermentescíveis para o processo de fermentação e/ou quanto de fontes proteicas de elevada massa molecular se almeja para a formação do corpo da cerveja e consistência da espuma (SENAI, 1997).

O extrato de mosto é constituído por 10-15% de substâncias originalmente solúveis em água, sendo o restante composto por produtos resultantes da hidrólise de macromoléculas por enzimas (amilases, proteases, β-glucanases, entre outras) presentes no malte. As amilases são responsáveis pela hidrolise do amido em açúcares fermentescíveis (glicose e principalmente maltose) e não fermentescíveis (dextrinas). Já as proteases produzem peptídeos e aminoácidos, a partir da degradação de proteínas. A β-glucanase hidrolisa o polissacarídeo β-glucana, presente na cevada que causa problema na filtração de mosto e cerveja. As temperaturas ótimas de atuação das enzimas estão mostradas na Tabela 3.

Tabela 3 - Temperatura ótima de atuação de diferentes enzimas.

Enzima	Temperatura ótima de atuação (ºC)
Glucanases	35-45
Proteases	45-55
β-amilases	60-65
α-amilases	70-75

FONTE: AMBEV.

b) Clarificação do mosto

O material sólido não solubilizado (extraído) para a fração líquida recebe o nome de bagaço de malte e deve ser retirado. Ocorre então a clarificação do mosto, etapa na qual o próprio bagaço é utilizado como material filtrante, pela recirculação do mosto até ser obtida a limpidez desejada. Terminada a etapa de filtração, o recheio filtrante (bagaço retido) é lavado com água aquecida a 78ºC para recuperação de compostos solúveis remanescentes, obtendo-se o mosto doce.

Podem-se utilizar diversos tipos de equipamentos para clarificação. O mais utilizado no Brasil é a tina de filtração, construída em aço inoxidável, que apresenta fundo falso perfurado, que permite reter o bagaço do malte e formar torta filtrante adequada (VENTURINI FILHO, 2000).

c) Cocção

Nesta etapa ocorre aquecimento do mosto à temperatura de fervura. Nela, ocorrem: a dissolução de adjunto açucarado (caso seja utilizado); concentração de compostos pela evaporação de água excedente; redução da carga microbiana do mosto; formação de compostos de cor e aroma pela caramelização de açúcares e reação de Maillard (reação entre açúcares redutores e aminoácidos); inativação das enzimas; coagulação de proteínas de elevada massa molar e outras macromoléculas presentes no mosto. Além disto, nesta etapa se dá a lupulagem, com isomerização e extração de compostos de amargor do lúpulo (α-ácidos), além da incorporação de compostos de aroma (óleos essenciais).

O tempo de cocção pode variar de 30 a 120 minutos a depender do tipo de processo e cerveja que se deseja obter (PRIEST *et al*, 2006). Obtém-se, assim, o mosto amargo. Ocorre ainda a decantação de um material sólido, denominado *trub* quente, material predominantemente proteico que se forma a partir da coagulação

de proteínas de elevada massa molar, cujas moléculas tendem a perder água de solvatação por ação do calor, o que promove sua desnaturação (MATHIAS, MELLO; SERVULO, 2014). O *trub* deve ser retirado do mosto para evitar problemas posteriores, principalmente na fermentação ou defeitos sensoriais na bebida.

2.1.5.3. Resfriamento e aeração

O mosto, ao final da cocção, encontra-se a uma alta temperatura, de aproximadamente 100ºC, e deve ser resfriado para temperatura entre 8 e 22ºC, dependendo do tipo de cerveja a ser produzida. Mostos de cerveja do tipo *Lager* são usualmente resfriados de 8 a 10°C, enquanto os do tipo *Ale* são resfriados, em média, à 18 a 22°C (DRAGONE; ALMEIDA; SILVA, 2010). Este resfriamento deve ser rápido para evitar formação de cor indesejável e contaminação microbiológica (PRIEST *et al*, 2006).

Após o resfriamento, é necessária ligeira areação do mosto, para disponibilizar oxigênio, que é essencial para o desenvolvimento da levedura na fase inicial da fermentação (BRIGGS *et al,* 2004).

2.1.5.4. Fermentação

Após o resfriamento/aeração, o mosto recebe as leveduras e é acondicionado em tanques de fermentação. Nesta etapa ocorre o processo de transformação de açúcares em álcool etílico, gás carbônico e outros produtos, como ácidos orgânicos, cetonas, ésteres, dentre outros, por ação da levedura cervejeira. Normalmente utilizam-se concentrações de células viáveis na ordem de 10^6 a 10^8 células/ml para a produção de cerveja (CARVALHO *et al,* 2011).

Durante a fermentação, é imprescindível o controle da temperatura para obtenção de uma cerveja com as características físico-químicas e sensoriais desejadas (FERREIRA, 2007). O aumento da temperatura de fermentação e da concentração de levedura são fatores que podem reduzir o tempo desta etapa (D’AVILA *et al*, 2012), mas afetam diretamente a qualidade sensorial da bebida.

2.1.5.5. Fermentação secundária/ maturação

Finalizada a fermentação alcoólica, a temperatura do processo é reduzida até 0°C para cessar o processo fermentativo. Neste momento, a cerveja é considerada um produto 'verde', com baixas concentrações de dióxido de carbono e um *flavour* inferior ao produto prontamente para o consumo. Nessa baixa temperatura, as células de leveduras decantam ao fundo do tanque fermentador e são retiradas por sucessivas purgas.

Na maturação, ocorre uma lenta fermentação complementar e alterações químicas que resultam em modificações de sabor e aroma, que conferem à cerveja aspectos sensoriais importantes. Este efeito positivo ocorre pela transformação e/ou consumo de alguns compostos indesejáveis, são eles, diacetil, compostos de enxofre, aldeídos e ácidos graxos. BRIGGS *et al*, 2004). Além disto, ocorre clarificação, dada pela precipitação de leveduras remanescentes, proteínas e sólidos (CEREDA, 1983).

2.1.5.6. Carbonatação

Nesta etapa, há um ajuste, geralmente por processo forçado ou natural, do teor de CO_2 na cerveja. A carbonatação é dita como o volume de dióxido de carbono dissolvido num dado volume de cerveja a 0ºC (TSCHOPE, 2001). Quando a carbonatação é forçada, a injeção de CO_2 em contra pressão deve ocorrer assepticamente e com o gás na sua forma mais pura e isenta de oxigênio, trazendo qualidade sensorial para a cerveja final. Já na carbonatação natural, o gás carbônico resultante da fermentação secundária é retido no fermentador, havendo pressurização e consequente incorporação ao meio líquido (BRIGGS *et al,* 2004*;* PRIEST *et al*, 2006).

2.1.5.7. Pasteurização

A pasteurização é o processo utilizado para redução da atividade microbiana, promovendo a estabilidade biológica da cerveja (REINOLD, 1997). A pasteurização pode se dar em túneis, após o envase, ou em linha, por trocadores de calor, previamente ao envase (VENTURINI FILHO, 2000).

2.1.5.8. Envase

A última operação da produção de cerveja é o envase, que consiste no engarrafamento ou embarrilhamento do produto final. Há uma série de embalagens que podem ser utilizadas, como latas, barris, tonéis e garrafas de vidro. Geralmente, escolhe-se o tipo de material para agregar valor ao produto. São quatro os principais pontos de controle desta etapa: controle de oxigênio dissolvido deve ser garantido a fim de preservar as características sensoriais, com concentração inferior a 0,2 mg/l assegurando que a cerveja não tenha processo oxidativo; temperatura de acondicionamento; teor de dióxido de carbono; e esterilidade da embalagem (BRIGGS *et al,* 2004).

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar como a atividade de proteases durante a mostura e a substituição parcial do malte de cevada por milho como adjunto interferem na qualidade e composição do mosto cervejeiro.

3.1. Objetivos específicos

Para que o objetivo geral seja alcançado, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- Produzir diferentes mostos cervejeiros variando o perfil da curva de mostura em função da execução ou não de degrau proteolítico e com ou sem introdução de milho como adjunto.
- Avaliar as características físico-químicas e de composição dos mostos doce e amargo produzidos. A saber, foram analisados: cor; acidez total; teores de extrato, açúcares redutores totais, compostos fenólicos totais e nitrogênio total; e atividade antioxidante.

Analisar estatisticamente os dados obtidos para estimação dos parâmetros físico-químicos que mais sofrem variação.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos experimentais de preparo dos mostos cervejeiros e as respectivas análises físico-químicas foram realizados nos laboratórios de Tecnologia das Fermentações e de Físico-Química de Alimentos do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus* Rio de Janeiro.

4.1. Matérias-primas

Para obtenção dos mostos cervejeiros, foram utilizadas as seguintes matérias-primas e adjunto, cujas características serão descritas a seguir:

- Água
- Malte de cevada
- Floco de milho comercial
- Lúpulo

4.1.1. Água

Para a produção dos mostos, a água potável oriunda da rede de abastecimento estadual (CEDAE/Rio de Janeiro/Brasil) foi previamente filtrada em carvão ativado para remoção de cloro e interferentes, a fim de torná-la adequada para a produção cervejeira, evitando possível inibição da ação das enzimas do malte e da atividade das leveduras na etapa fermentativa.

4.1.2. Malte

Na elaboração dos mostos cervejeiros foi utilizado o malte tipo Pilsen, proveniente da marca ‘Agrária’ (Paraná/Brasil), ilustrado na Figura 3, normalmente utilizado pelas cervejarias como malte base devido ao seu elevado poder diastásico (TSCHOPE, 1999). Foi adquirido no comércio local, em um único lote de 5,0 kg a fim de atender todos os experimentos. A Tabela 4 informa as especificações do malte utilizado.

Figura 3 - Malte tipo Pilsen.

Tabela 4- Especificação do malte Pilsen Agrária.

Parâmetro analisado	Valor
Umidade	4,7 %
Viscosidade	1,52 mPa.s
b-glucanos	191 mg/l
Cor do mosto	3,2 EBC
Cor cocção	5,8 EBC
Nitrogênio solúvel	719 mg/100g
Proteína	11 %
pH	5,93

FONTE: Agrária.

4.1.3. Flocos de milho

O adjunto de estudo utilizado para formulação dos mostos cervejeiros foi o milho em forma de flocos (Kimilho Flocão, Yoki®). Foram adquiridos três diferentes lotes do produto no comércio local, que foram devidamente homogeneizados. Dentre as etapas de fabricação de farinha de milho flocado, ocorre a degerminação do grão eliminando o conteúdo lipídico do cereal (ALESSI *et al*., 2003). A Tabela 5 informa as características contidas na embalagem do produto.

Tabela 5 - Características do floco de milho.

Nutrientes	Quantidade/100 g
Valor energético	350 Kcal
Carboidratos	80 g
Proteínas	5,6 g
Gorduras totais	0 g
Fibra alimentar	2 g

4.1.4. Lúpulo

Foi utilizado lúpulo (Hallertau Perle, HGV®, Alemanha) na forma de *pellets* (Figura 4), contendo teor de α-ácidos de 9,7%, com características de aroma e amargor.

Figura 4 - Lúpulo em *pellets.*

4.2. Produção dos mostos cervejeiros

Os mostos, doce e amargo, foram produzidos seguindo um planejamento experimental fatorial de dois fatores e dois níveis (2^2), em triplicata (Tabela 6). Como variável independente, foi avaliada a adição ou não de adjunto (milho), cuja faixa adotada foi entre 0% e 45%, percentuais permitidos pela legislação vigente (Brasil, 2009). A outra variável de estudo foi a execução ou não de degrau proteolítico nas temperaturas ótimas de atuação de proteases do malte (45ºC e 55ºC) durante a mostura. As variáveis respostas escolhidas foram: cor, acidez total, teor de extrato, açúcar redutor total, compostos fenólicos totais, nitrogênio total e atividade antioxidante.

Ademais, foram estabelecidos os parâmetros de produção e processo de forma a serem obtidos mostos típicos da produção de cerveja do tipo *Pilsen*, prevendo extrato igual ou superior a 10,5ºP e inferior a 12,5ºP, teor alcoólico entre 2,8 e 4,2% v/v e amargor de 12 IBU.

Tabela 6 - Planejamento experimental para produção dos mostos cervejeiros.

Experimento	Degrau proteolítico		Concentração de adjunto (%)
	T(°C)	t(min)	
C1	- inexistente-		0
C2	45 55	15 15	0
C3	- inexistente-		45
C4	45 55	15 15	45

FONTE: autor.

4.2.1 Moagem do malte

Para exposição das frações dos grãos de malte, foi realizada sua moagem utilizando moinho de cereais com sistema de moagem com discos. A distância entre os discos foi ajustada em 1 mm, o que promoveu a moagem dos grãos mantendo, contudo, as cascas o mais integras possível, tendo em vista seu fundamental papel na etapa de clarificação do mosto.

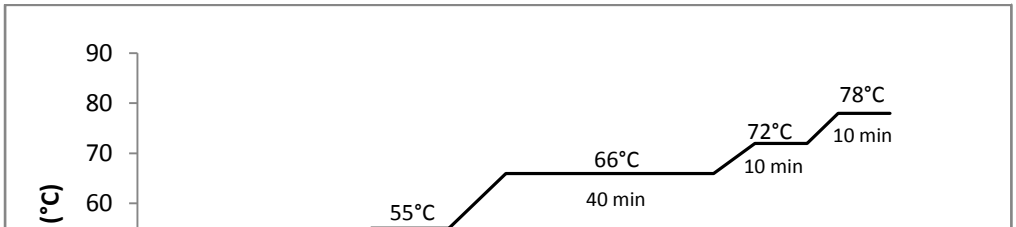
4.2.2. Mostura

A mostura se deu em bécheres de capacidade de 2,0 litros, imersos em banho de aquecimento (NOVA ética) termostatizados, e acoplados de agitadores automáticos em hélice com regulagem de rotação (Fisatom, 713D), conforme Figura 5.

Figura 5 – Aparato utilizado na etapa de mostura.

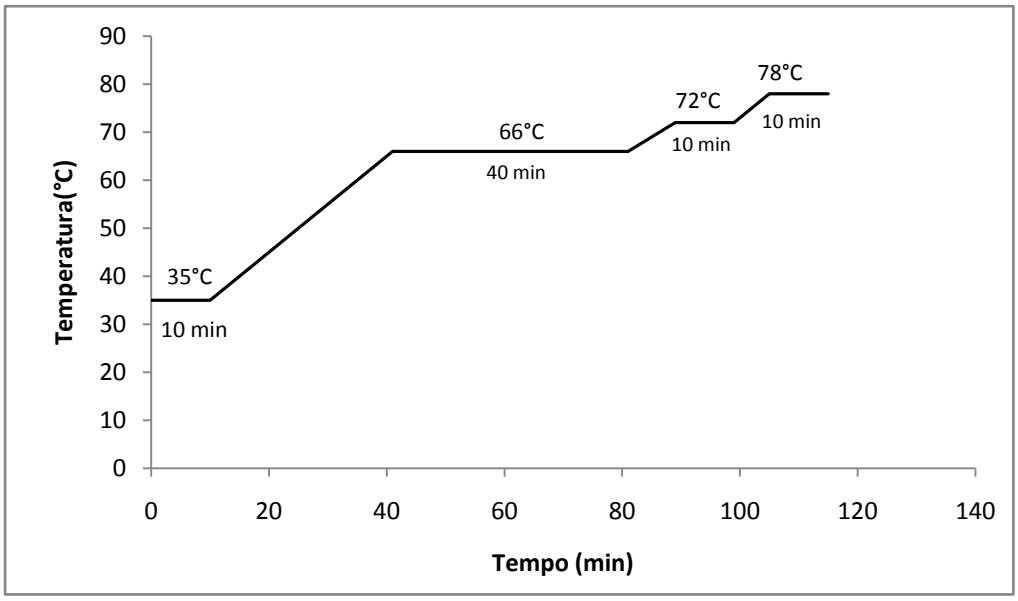
As Figuras 6 e 7 apresentam as curvas de mostura utilizadas que serão descritas em seguida.

Figura 6 - Curva de mostura com degrau proteolítico.



FONTE: autor.

Figura 7 - Curva de mostura sem degrau proteolítico.



FONTE: autor.

Para a realização da mostura, com ou sem adjunto e com ou sem degrau proteolítico, o malte foi misturado com água, na proporção de cereal (maltado ou não) e água de 1:4 (m/v), conforme descrito por Venturini e colaboradores (2010). Em seguida, a mistura malte/água foi acrescida de 0,1 g/l de cloreto de cálcio para promover estabilização das enzimas atuantes no processo (TSCHOPE, 2001).

Em ambas as curvas de mostura, as rampas de aquecimento se deram na taxa de 1ºC/min; e, para todos os casos, a mistura malte/água permaneceu a 35°C

durante 10 minutos, para promover a dissolução de componentes solúveis presentes no cereal maltado. Os degraus proteolíticos, quando adotados, compreenderam as temperaturas de 45 e 55°C. Os demais degraus de interesse foram para a atuação de beta-amilases e alfa-amilases (66 e 72°C, respectivamente), responsáveis pela conversão do amido em açúcares fermentescíveis.

O término da mostura (*mash out*) foi determinado pela realização do teste de iodo. A reação do iodo (solução alcoólica de iodo em iodeto de potássio 2 %), com amido livre forma um complexo de coloração roxo escuro. Quando a ausência de amido no meio tem-se o desenvolvimento de coloração amarela em substituição à cor roxa (PETKOWICS, 2007).

Para obtenção dos mostos sem a adição de adjunto (mosto puro malte), misturou-se malte e água na proporção de 1:4 (m/v), ou seja, 200 g de malte *Pilsen* e 800 ml de água previamente aquecida a 35°C. Já para realização da mostura com malte de cevada e adjunto amiláceo (flocos de milho), seguiu-se ainda a mesma proporção malte/adjunto:água de 1:4 (m/v), porém o conteúdo de cereal (malte e milho) foi fracionado em 110 g (55%) de malte de cevada e 90 g (45%) de adjunto amiláceo.

No último caso, apenas a mistura malte de cevada e água permaneceu a 35°C durante 10 minutos, já que o adjunto teve tratamento diferenciado. O floco de milho não é inserido no início da mostura, por ser um adjunto não malteado e pelo fato de o amido em sua composição apresentar temperatura de gelatinização diferente da que o amido do malte apresenta. Desta maneira, é necessária etapa de tratamento prévio e em separado de gelatinização para posterior exposição às enzimas amilolíticas presentes no malte (VARNAM *et al*, 1997; PERPETE *et al*, 2000). A temperatura de gelatinização do milho para exposição do grânulo de amido foi de 63°C (CIACCO, CRUZ, 1882) e utilizou-se uma quantidade de água primária na mesma percentagem de adjunto (45% da massa total de água) para a gelatinização. Após esta etapa, o adjunto foi inserido na etapa de mostura à temperatura ótima de atuação da beta-amilase (66°C).

Para o término da mostura, após realização do teste do iodo para avaliar presença de amido no mosto, a temperatura foi elevada a 78°C, por 5 minutos, para inativação das enzimas. O mosto seguiu para a etapa de clarificação.

4.2.3. Clarificação

Ao final da mostura, tem-se o mosto constituído por sólidos solúveis (açúcares fermentescíveis, dextrinas, proteínas, etc) (TSCHOPE, 2001) em água, juntamente com a parte insolúvel do grão de malte e as frações não solubilizadas. Este material sólido deve ser separado (recebe o nome de bagaço de malte) e, por isto, tem início a etapa de clarificação do mosto, que foi realizada por circulação do mosto em panela de fundo falso com perfurações de diâmetro de 0,6 – 0,7 mm. Neste fundo falso ocorre retenção da fração sólida e formação de camada filtrante, na qual são retidas as frações menores de sólidos em suspensão, até que seja atingida a limpidez desejada.

Para aumentar a extração de açúcares e outros compostos solúveis que comumente permanecem retidos na umidade do bagaço, a fração sólida foi lavada com água, chamada de água secundária, previamente aquecida a 78ºC, na proporção de 1:1 (v/v) em relação à água primária utilizada na mostura.

Além desta clarificação, para atestar a retirada total das partículas menores que não foram retidas pela torta de filtração, utilizou-se um filtro de algodão para eliminação total dos sólidos do mosto. Obtém-se assim o mosto doce livre de partículas sólidas em suspensão. A Figura 8 ilustra a panela de clarificação.

Figura 8 - Panela de fundo falso utilizada na clarificação.

4.2.4. Cocção

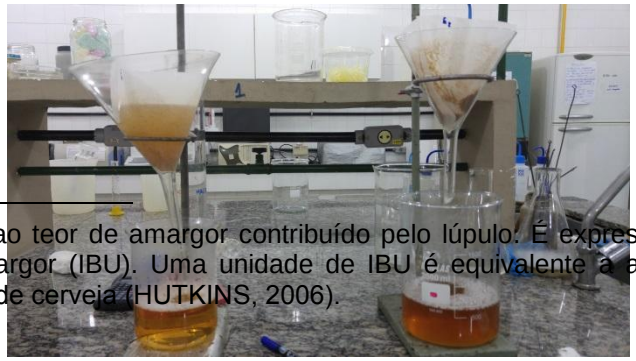
O mosto doce clarificado foi submetido ao processo de cocção em que se elevou a temperatura até sua fervura; este aquecimento se deu em placas de aquecimento resistivo e em frascos Erlenmeyer (Figura 9), por 60 min.

Durante esta etapa foi realizada a lupulagem com o propósito de alcançar o amargor desejado de 12 IBU[2]. A lupulagem foi feita em duas partes, ao início da cocção (5 minutos de fervura) e ao final (55 minutos de fervura). A massa de lúpulo adicionada foi calculada em função do volume de mosto doce. Para obtenção de 12 IBU são necessários cerca de 8 mg/l de iso-α-ácidos. Para tanto, foi considerada uma eficiência de 30% de isomerização dos compostos de amargor durante a fervura. Para cada litro de mosto, portanto, são necessários 0,3 g do lúpulo escolhido. Foi utilizada a mesma variedade de lúpulo (Hallertau), tanto para lupulagem inicial (amargor) e final (aroma).

Ao final da cocção, houve a separação por filtração do precipitado formado, composto predominantemente por proteínas de elevada massa molecular e compostos fenólicos, o chamado *trub* quente. Para tal, o mosto foi filtrado em filtro de papel com composição de fibra 100% celulósica (Figura 10). O *trub* deve ser totalmente eliminado a fim de evitar formação de *off-flavour* no produto final além de inibir a adequada atividade metabólica das leveduras cervejeiras (BRIGGS et al, 2004).

Figura 9 - Processo de cocção.

Figura 10 - Filtração do mosto amargo.



[2] IBU corresponde ao teor de amargor contribuído pelo lúpulo. É expresso em termos de Unidade Internacional de Amargor (IBU). Uma unidade de IBU é equivalente a aproximadamente 1 mg de ácidos iso-α por litro de cerveja (HUTKINS, 2006).

4.3. Determinações analíticas

As amostras de mosto doces e amargos provenientes dos experimentos foram centrifugadas à 300 rpm (10 G-força) por 5 minutos, garantido máxima separação de possíveis sólidos em suspensão. A seguir, são descritas as técnicas utilizadas nas análises físico-químicas, as quais contemplam as principais avaliações estudadas para melhor compreensão e otimização do processo e qualidade da produção de cerveja. Todas foram realizadas em triplicata.

4.3.1. Extrato (°P)

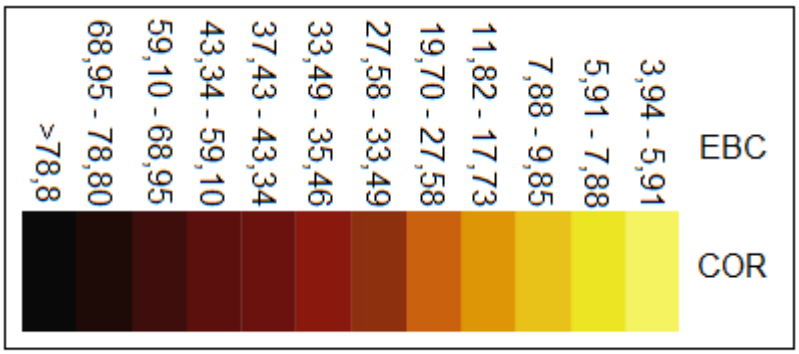
Foram avaliados e determinados, tanto para o mosto doce quanto para o mosto amargo: o extrato (°P), a densidade e a quantidade de calorias, em equipamento específico para análise de mostos e cervejas, o AlcolyzerBeer ME (Anton Paar, DMA 4500M pH).

4.3.2 Cor

A cor dos mostos doces e amargos foi determinada de acordo com a *European Brewery Convention* – EBC[3] (Figura 11), em um colorímetro de bancada (Comparador 3000 - AF607 EBC). A análise é avaliada comparando as amostras com dois padrões simultaneamente, tornando a combinação de cores mais precisa. Esta análise apresenta faixa da gama de 2-27(EBC) unidades visuais, do amarelo pálido para cervejas na extremidade baixa da escala, ao vermelho, para cervejas mais escuras na extremidade superior da escala.

[3] A escala de cor EBC é um método reconhecido para gradação de cores de cervejas, maltes, caramelos e líquidos coloridos semelhantes.

Figura 11 - Escala de cores de cerveja (EBC).



FONTE: Adaptado de BJCP Guideline 2008

4.3.3. Determinação de acidez titulável e do pH

A acidez total foi obtida por titulometria utilizando NaOH 0,1M como titulante e fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em percentual de acidez (m/V) (ADOLFO LUTZ, 2005). O pH foi medido por determinação direta em pHmetro de bancada (QUIMIS).

4.3.4. Determinação de açúcares redutores totais (ART) pelo método DNS

O teor de açúcares redutores totais (ART) nos mostos foi determinado pelo método do DNS (ADOLFO LUTZ, 2005), que se baseia na reação entre o açúcar redutor presente na amostra (glicose ou maltose), que sofre oxidação, e o ácido 3,5-dinitrosalicílico, que se reduz a um composto de cor variando entre o amarelo e o castanho-avermelhado, o ácido 3-amino-5-nitrosalicílico. Os resultados foram calculados com base em uma curva padrão de glicose (Apêndice A) que relaciona a concentração de açúcar redutor (em m/v) e a absorbância (540 nm) lida após reação com o DNS.

4.3.5. Determinação de compostos fenólicos totais

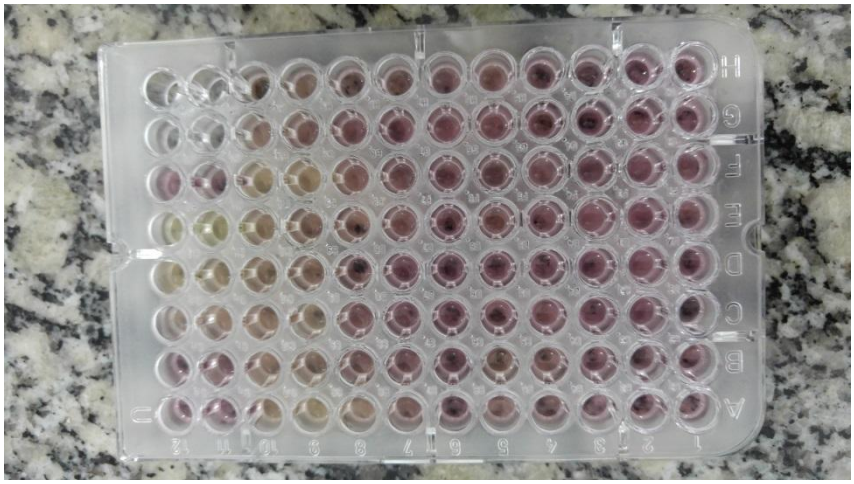
O teor de compostos fenólicos totais foi determinado pela técnica espectrofotométrica de Folin-Ciocalteau (ROSSI, 1965). Os resultados encontrados foram calculados e expressos em mg ácido gálico/l com base em uma curva padrão [Ác. Gálico X Abs], apresentada no Apêndice B.

4.3.6. Determinação da atividade antioxidante através do método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)

As amostras de mosto tiveram sua atividade antioxidante determinada pelo método do DPPH (BRAND-WILLAMS *et al.,* 1995), modificada por Kim e colaboradores (2002), que tem como base a redução da absorbância (515 nm) do DPPH pela ação de agentes antioxidantes. Nesta análise, é utilizado o DPPH na concentração de 100 µM (3,9 ml) dissolvidos em metanol (80%). Adiciona-se 0,1 ml da amostra ou padrão, homogeneizando-se cuidadosamente e mantem-se na ausência de luminosidade, à temperatura ambiente, durante 30 minutos. A concentração de DPPH no meio é calculada conforme a curva padrão obtida com utilização de um antioxidante padrão, o Trolox. Os resultados são expressos em TEAC (capacidade antioxidante trolox equivalente), em µmol TEAC/100g de amostra de mosto cervejeiro. O resultado também é expresso em porcentagem de atividade antioxidante (%AA) que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo agente antioxidante. A concentração de agente antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada “concentração eficiente”, também chamada de “concentração inibitória” (IC_{50}) (SOUSA *et al*, 2007).

A Figura 12 ilustra a microplaca constituídas de amostras para leitura das absorbâncias da atividade antioxidante das amostras de mosto.

Figura 12 - Microplacas para leitura das absorbâncias das amostras em reação com ácido gálico.



4.3.7. Determinação do teor de nitrogênio

Os teores de nitrogênio total foram obtidos pelo método de Kjeldhal, que também possibilita a determinação indireta de proteínas nas amostras analisadas, com a utilização de um fator de conversão adequado. Este método é baseado na decomposição da matéria orgânica através da digestão da amostra a 400°C com ácido sulfúrico concentrado, e em presença de sulfato de cobre como catalisador, favorecendo a oxidação da matéria orgânica. O nitrogênio presente na amostra é determinado por destilação por arraste à vapor (Figura 13), seguida por uma titulação com ácido diluído (Nogueira e Souza, 2005). As fórmulas e o fator utilizados para os cálculos encontram-se no Apêndice B.

Figura 13 - Destilador por arraste à vapor.

4.3.8. Análises estatísticas

Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados apresentados como média e desvio padrão (DP). Todas as variáveis foram submetidas à análise de efeitos utilizando o *software* Statistica 7.0.

4.3.8.1. Tamanho de efeito

O estudo de tamanho de efeito em publicações científicas está sendo cada vez mais estimulado para avaliação de resultados. Esta análise é um complemento ao teste de significância da hipótese nula estatística. Além disso, o tamanho de efeito é útil na comparação de efeitos em um único estudo, quando há mudança na variável de estudo em escala diferente, que neste estudo são concentração de adjunto e ocorrência ou não de degrau proteolítico.

Há diversas maneiras da avaliação estatística de tamanho de efeito tais como: o Teste de Cohen, Teste de Glass, Teste de Hedges, Teste ψ (Psi), dentre outros. Nestes testes, utilizam-se as médias dos resultados para cálculo do efeito (BISQUERRA, 2004). Para obtenção dos resultados, foi utilizado o *software Statistica*®.

4.3.8.2. Teste t de *student*

O teste t *student* é o método mais utilizado para avaliação de diferenças entre médias entre dois grupos. As hipóteses a serem testadas são:

$H_{0:}$ a média da amostra é igual à média da referência

H_1: a média da amostra é diferente à média da referência

A hipótese nula é a hipótese de igualdade. Esta é denominada de hipótese de nulidade e é representada por H_0, que é normalmente formulada com o objetivo de ser rejeitada. A rejeição da hipótese nula envolve a aceitação de outra hipótese denominada de alternativa.

- Para cálculo do Teste t independente

Aplica-se a fórmula:

$$t = \frac{M1 - M2}{\sqrt{\frac{S1^2}{n1} + \frac{S2^2}{n2}}}$$

Onde:

M_1 e M_2 são as médias de cada grupo

s_1 *e* s_2 são os desvios padrão para cada grupo

n_1 e n_2 o número de sujeitos de cada grupo.

Os graus de liberdade são calculados assim: $gl = n_1 + n_2 - 2$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta sessão serão apresentados os resultados e a discussão das análises de caracterização referentes aos mostos doces e amargos produzidos a partir das diferentes condições estabelecidas. Para facilitar a explicação, os resultados de caracterização físico-química foram agrupados em uma seção, e os resultados de composição e atividade antioxidante avaliados na seção posterior.

5.1. Parâmetros físico-químicos

As Tabelas 7 e 8 apresentam os resultados das análises de extrato (°P) dos mostos doces e amargos e as respectivas análises estatísticas de efeito dos mesmos para discussão.

Tabela 7 - Valores médios e desvio padrão do extrato (°Plato).

Amostra	Mosto doce (°P)	Mosto Amargo (°P)
C1	8,5±0,5	13,8±0,5
C2	10,2±0,6	18,9±0,6
C3	9,5±1,0	14,7±0,7
C4	10,3±0,3	19,0±0,8

C1: sem degrau proteolítico e sem adjunto; C2: com degrau proteolítico e sem adjunto; C3: sem degrau proteolítico e com adjunto; C4: com degrau proteolítico e com adjunto.

Tabela 8 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito – Extrato.

Variável	Mosto doce	Mosto amargo
Degrau proteolítico	1,2*	3,5*
Adjunto	0,5	1,65

Valores com (*) indicam que o efeito foi significativo para $p<0,05$

Quanto à classificação dos mostos produzidos, observa-se que avaliando o extrato (°P) determinado, apenas o experimento C1 (sem adição de adjunto e sem parada proteolítica) pode gerar uma cerveja classificada como cerveja extra, segundo legislação vigente (Brasil, 1997), tendo em vista que o extrato primitivo (ou seja, o extrato do mosto amargo) encontra-se entre 12,5 e 14°Plato. Para os demais mostos, a cerveja produzida seria classificada como extra forte, devido ao elevado teor de extrato, maior que 14°Plato, não estando em conformidade com o padrão de cerveja tipo *Pilsen*. Vale ressaltar que diversos fatores afetam o extrato primitivo do mosto, como a relação cereal/água, a curva de mostura adotada e a introdução de adjuntos de maior teor de carboidratos que o malte.

Observa-se também que os mostos C2 (sem adjunto) e C4 (com adjunto), para os quais houve degrau proteolítico durante a condução da etapa de mostura, apresentaram maior teor de extrato, para ambos os estágios da produção (após a

clarificação e após a cocção), se comparados aos mostos C1 e C3 (Tabela 7). Sabe-se que o endosperma, fração do grão rica em amido, é envolto por uma matriz de proteínas estruturais insolúveis (aleurona), a qual deve ser degradada a fim de facilitar a ação enzimática sobre o amido (LEWIS, 2001; LIMBERGER, 2011). Desta forma, com a influência do degrau proteolítico na redução da camada de aleurona, há maior exposição das moléculas de amido e a atuação das enzimas beta e alfa-amilase é otimizada, havendo maior liberação de material solúvel (mono, di e trissacarídeos, bem como dextrinas), elevando-se o extrato do mosto. Tais considerações são corroboradas pela análise estatística apresentada na Tabela 8, que indica que o fator degrau proteolítico apresenta influência significativa e positiva sobre o extrato dos mostos avaliados.

Para os pares C1(sem adjunto) /C3(com adjunto) e C2(sem adjunto) /C4(com adjunto), os quais diferem pela adição de adjunto, não se observa aumento expressivo (sem efeito estatístico significativo mostrado na Tabela 8) para o teor de extrato dos mostos doces e amargos quando adicionados de milho em substituição ao malte de cevada (45% em massa). Embora o milho apresente maior teor de amido em sua composição, seu baixo poder diastásico compromete a eficiência da hidrólise desta macromolécula, limitando o teor de extrato obtido no mosto. Desta forma, a utilização do milho promove apenas uma redução dos custos do processo, devido seu baixo custo em relação ao malte de cevada, mas não altera o extrato primitivo do mosto.

Em relação à acidez titulável dos mostos, os resultados e as respectivas análises estatísticas são apresentados nas Tabelas 9 e 10.

Tabela 9 - Valores médios e desvio padrão da acidez nos mostos.

Amostra	Mosto doce (%m/v)	Mosto Amargo (%m/v)
C1	0,7±0,1	1,0±0,2
C2	0,6±0,1	0,9±0,05
C3	0,4±0,09	0,5±0,1
C4	0,4±0,1	0,9±0,1

C1: sem degrau proteolítico e sem adjunto; C2: com degrau proteolítico e sem adjunto; C3: sem degrau proteolítico e com adjunto; C4: com degrau proteolítico e com adjunto.

Tabela 10 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito – Acidez.

Variável	Efeito mosto doce	Efeito mosto amargo
Degrau proteolítico	0	0,1
Adjunto	-0,3*	-0,2*

Valores com (*) indicam que o efeito foi significativo para p<0,05

Pode-se verificar que os mostos apresentaram valores de acidez mais elevados foram aqueles produzidos somente com malte de cevada (C1 e C2), como mostra a Tabela 9. Tal fato pode ser associado à presença de maior teor de compostos do malte, como ácidos fenólicos, que embora afetem pouco o pH (por serem ácidos orgânicos fracos), influenciam a acidez titulável. O aumento de acidez observado para os mostos amargos é devido à concentração do mosto e à adição de lúpulo, que apresenta em sua composição ácidos orgânicos de extrema importância para o processo cervejeiro. Ainda, segundo Bobbio e Bobbio (1995), a ocorrência de reação de *Maillard* (entre aminoácidos e açúcares redutores), comum durante a etapa de cocção do mosto, promove a liberação de compostos ácidos. A análise estatística dos efeitos (Tabela 10) corrobora esta hipótese, apresentando efeito significativo e negativo para a introdução de adjunto.

Percebe-se, avaliando a estatística de efeito presente na Tabela 10, que o degrau proteolítico não tem influência significativa na acidez do mosto.

A Tabela 11 apresenta os resultados para a análise de cor dos mostos doces e amargos, e a Tabela 12 a análise estatística dos efeitos.

Tabela 11 – Valores médios e desvio padrão da cor do mosto.

Amostra	Mosto doce (EBC)	Mosto Amargo (EBC)
C1	9,5±0,3	15,0±0,7
C2	12,5±0,1	20,5±0,9
C3	4,5±0,1	6,5±0,1
C4	5,5±0,1	9,5±0,3

C1: sem degrau proteolítico e sem adjunto; C2: com degrau proteolítico e sem adjunto; C3: sem degrau proteolítico e com adjunto; C4: com degrau proteolítico e com adjunto.

Tabela 12 – Resultados da análise estatística de tamanho de efeito – cor.

Variável	Efeito Mosto doce	Efeito mosto amargo
Degrau proteolítico	0,18*	0,31*
Adjunto	-0,47*	-0,96*

Valores com (*) indicam que o efeito foi significativo para p<0,05

De modo geral, observa-se que a condução do degrau proteolítico promove aumento significativo da cor dos mostos, comparando os pares C1/C3 e C2/C4, os quais se diferenciam pela passagem proteolítica (Tabela 11). A análise dos efeitos (Tabela 12) indica que estas diferenças são significativas estatisticamente. Este resultado pode ser devido à diferentes fatores como: o aumento do tempo de mostura (em 30 minutos) aumentando a extração de compostos do malte; a liberação de maior teor de aminoácidos, que na presença de açúcares redutores em elevadas temperaturas irão participar das reações de Maillard (HOUGH *et al*, 1971), com formação de compostos de cor; e a possível maior liberação de açúcar redutor (conforme será discutido adiante), devido à melhor atuação de enzimas amilolíticas, havendo caramelização e reação de Maillard.

Em relação aos pares C1/C2 e C3/C4, os quais se diferem na adição do adjunto, observa-se que a introdução de milho em substituição parcial ao malte de cevada promove significativa redução da cor dos mostos doces e amargos (Tabela 12). Diversos fatores estão associados a esta variável, mas pode-se destacar a redução da concentração de compostos de cor extraídos do malte, visto que no processo de malteação do cereal há uma etapa de secagem, o que promove aumento da intensidade de sua coloração e consequentemente do mosto a ser produzido. Steiner e colaboradores (2012) constataram que a presença do adjunto, mesmo rico em nitrogênio, mas não malteado (como a cevada), promove a diminuição da cor, ratificando a hipótese da influência da etapa de secagem do malte sobre a formação de compostos de cor. Além disso, a introdução do milho, cereal pobre em conteúdo proteico, reduz a capacidade do mosto para a obtenção de coloração mais escura, já que o conteúdo de aminoácidos é reduzido, minimizando as reações de escurecimento (M*aillard*) no preparo do mosto.

A cor dos mostos amargos é superior ao do mosto doce como mostra Tabela 11, pois há considerável concentração dos componentes, devido à evaporação de água. Ademais, em altas temperaturas, há ocorrência da caramelização de açúcares e formação de compostos da reação de Maillard, conferindo mais intensidade de cor para o mosto amargo.

Avaliando as estatisiticas *t student* dos Quadro 5, 6, 7 e 8 (Anexo, apêndice A) para mosto doce e amargo, podemos confirmar ainda que os resultados de cor são influenciados quando na presença de adjunto amiláceo (t crítico<Stat t). A cor do mosto é diretamente influenciada pelo cereal utilizado, neste caso, adicionando-se o cereal milho, o qual tem em sua composição, menores teores de proteínas em comparação ao malte de cevada, reduz reações de formação de cor. Ademais, o processo de malteação da cevada também confere cor ao grão que é extraído para o mosto no momento de seu preparo.

5.2. Resultados de ART, fenólicos totais, nitrogênio total e atividade antioxidante

5.2.1 Açúcares redutores totais

Os resultados de teor de açúcares redutores totais para os mostos doces e amargos são apresentados na Tabela 13 e as análises estatísticas dos efeitos na Tabela 14.

Tabela 13 - Valores médios e desvio padrão para ART.

Amostra	Mosto doce (g/l)	Mosto Amargo (g/l)
C1	17,7±0,3	34,6±0,6
C2	19,6±0,6	37,6±0,9
C3	18,0±0,1	35,8±0,7
C4	19,4±0,3	37,7±0,9

C1: sem degrau proteolítico e sem adjunto; C2: com degrau proteolítico e sem adjunto; C3: sem degrau proteolítico e com adjunto; C4: com degrau proteolítico e com adjunto.

Tabela 14 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito – ART.

Variável	Efeito mosto doce	Efeito mosto amargo
Degrau proteolítico	1,6*	0,23*

Adjunto	0,08	0,5

Valores com (*) indicam que o efeito foi significativo para p<0,05

O teor de ART se refere especificamente à concentração de açúcares redutores presentes no mosto, enquanto que o extrato (°Plato) corresponde ao teor de sólidos solúveis totais (proteínas, açúcar, entre outros). Desta maneira, a avaliação do extrato tem grande importância para a classificação da cerveja e apresenta grande influência sobre diversos parâmetros sensoriais da bebida. Entretanto, é o teor de açúcares redutores, e também fermentescíveis, que está diretamente relacionado ao fornecimento de substrato para a levedura cervejeira, cuja atividade resultará na formação de etanol e gás carbônico no meio. Vale relembrar que a presença de açúcares redutores no mosto é resultado da hidrólise do amido presente na matéria prima. Desta maneira, espera-se que o teor de amido disponibilizado e a exposição destas macromoléculas para atuação das enzimas tenham efeito sobre o teor de açúcares no mosto.

Verifica-se que os, sejam doces ou amargos, que apresentaram maiores teores de ART foram aqueles em que, no processo de mostura, houve o degrau proteolítico (C2 e C4), indicando que a hidrólise de proteínas favoreceu a atuação de enzimas amilolíticas. Os valores são diferentes estatisticamente, como mostra a Tabela 14, que indica um efeito positivo e significativo para o degrau proteolítico. O teor de ART mais elevado nos mostos amargos (Tabela 13) é explicado pela concentração de seus componentes causada pela fervura durante 60 minutos, com perda de água por evaporação.

Estes resultados corroboram a hipótese estabelecida anteriormente para os resultados de extrato (°Plato), de que o degrau proteolítico promove a hidrólise de proteínas que aprisionam o amido, aumentando a exposição de suas frações para atuação enzimática. Esta proposição é confirmada, ainda, pelos resultados obtidos por HU e colaboradores (2014), que mostraram que a proteólise teve grande impacto sobre a degradação do amido, incluindo sobre os teores de açúcares do mosto resultante.

Semelhantemente aos resultados obtidos para o teor de extrato, como mostrado na Tabela 7, a introdução de milho como adjunto não apresentou efeito

significativo sobre o teor de açúcares nos mostos doces ou amargos, como observado nas Tabelas 13 e 14 para o par C2/C4. Isto corrobora a hipótese de que, embora o milho apresente maior teor de amido em sua composição, há uma perda de poder diastásico total, reduzindo a eficiência de hidrólise do amido durante a mosturação. Embora o milho não tenha relevância significativa sobre um aumento do teor de ART presente no mosto, este resultado se mostra satisfatório no âmbito industrial, em que se deseja obter o mesmo conteúdo de açúcares fermentescíveis, porém reduzindo custo de produção, já que o valor comercial do milho é inferior ao malte de cevada.

Observando nos resultados dos Quadros 9 e 10 (Anexo 1, Apêndice A), percebe-se que não há interferência de adjunto (t crítico é maior que Stat t) para a quantidade de ART. Desta forma, avaliou-se a interferência do degrau proteolítico considerando C1-C3 (sem degrau) e C2-C4 (com degrau) como mesma amostra para mais fácil compreensão dos resultados. Os resultados para avaliação do degrau proteolítico estão nos Quadros 11 e 12 (Anexo 1).

5.3. Teor de compostos fenólicos totais

As Tabelas 15 e 16 apresentam os resultados e análises estatísticas de efeito para o teor de compostos fenólicos totais nos mostos produzidos.

Tabela 15 - Valores médios e desvio padrão para fenólicos totais.

Amostra	Mosto doce (GAE mg/l)	Mosto Amargo (GAE mg/l)
C1	268,3±19	544±29
C2	390±2,2	654±11,3
C3	165,4±6,8	311,9±7,2
C4	239,5±24,5	340,1±6,4

C1: sem degrau proteolítico e sem adjunto; C2: com degrau proteolítico e sem adjunto; C3: sem degrau proteolítico e com adjunto; C4: com degrau proteolítico e com adjunto.

Tabela 16 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito – Fenólicos.

Variável	Efeito mosto doce	Efeito mosto amargo
Degrau proteolítico	73,7*	129,2*
Adjunto	-105,6*	-264,6*

Valores com (*) indicam que o efeito foi significativo para $p<0,05$

Pode-se verificar que as amostras produzidas apenas com malte de cevada (C1 e C2) apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais no mosto amargo (544,0 e 654,0 GAE mg/l, respectivamente), conforme indicado na Tabela 15. Quando adicionados de milho como adjunto, os mostos (C3 e C4) apresentaram resultados bem inferiores (311,9 e 340 GAE mg/l, respectivamente). A diferença do teor de compostos fenólicos em função da introdução de milho apresenta efeito negativo e significativo, como indicado na Tabela 16.

Isto pode ser explicado pelo fato dos principais compostos fenólicos presentes no meio serem provenientes da casca da cevada (que fornece ao mosto cerca de 70 a 80% do teor total de fenólicos), embora uma parte seja proveniente do lúpulo (responsável por 20 a 30% do teor de fenólicos) (FREITAS *et* al, 2006). O milho, por sua vez, apresenta teor de compostos fenólicos em sua composição relativamente baixa. Estudos de compostos bioativos realizados por Paraginski e colaboradores (2015) demonstram que o conteúdo de compostos fenólicos totais nos grãos de milho foi de 1,77 mg $GAE.g^{-1}$. Nos estudos realizados por Rocha e colaboradores (2014) em grãos de malte de cevada, foram encontradas quantidades significativas de compostos fenólicos, de no máximo 440,27 mg $GAE.g^{-1}$.

Além disso, o conteúdo de compostos fenólicos presentes no mosto e na cerveja depende da condução do processo cervejeiro industrial aplicado. Sendo assim, avaliando as amostras dos mostos C2 e C4, para os quais na etapa de mostura houve a parada nas temperaturas de 45°C e 55°C (ação proteolítica), e comparando-os aos mostos C1 e C3 (sem parada nas temperaturas citadas), percebe-se que o degrau proteolítico favoreceu a liberação de compostos fenólicos. Isto pode ser explicado pelo maior tempo de contato (30 minutos a mais) durante a mostura, aumentando a extração de compostos fenólicos das cascas dos grãos (CURI, 2009).

Gonzalez e colaboradores (2001) afirmam que a liberação de fenólicos está diretamente relacionada à cor do mosto e da cerveja final, assim como o aroma, adstringência e sabor. Podemos confirmar tal fato comparando as Tabelas 11 e 15, as quais mostram que os mostos com maiores teores de fenólicos totais são aqueles que apresentaram coloração mais escura (C1 e C2).

5.4. Avaliação do teor de nitrogênio total

Os valores das concentrações de nitrogênio total são apresentados na Tabela 17 e a análise dos efeitos na Tabela 18, para os quatro mostos produzidos.

Tabela 17 - Valores médios e desvio padrão para nitrogênio total.

Amostra	Nitrogênio/Mosto doce (%)	Proteína/Mosto doce (%)*	Nitrogênio/Mosto Amargo (%)	Proteína/Mosto Amargo (%)*
C1	0,7±0,01	4,4	0,7±0,1	4,4
C2	1±0,02	6,25	1±0,1	6,25
C3	0,5±0,1	3,12	0,5±0,0	3,12
C4	0,6±0,1	3,75	0,8±0,0	3,75

C1: sem degrau proteolítico e sem adjunto; C2: com degrau proteolítico e sem adjunto; C3: sem degrau proteolítico e com adjunto; C4: com degrau proteolítico e com adjunto.

* (Mesmo desvio padrão para nitrogênio e proteína- %P=6,25 x %N)

Tabela 18 - Resultados da análise estatística de tamanho de efeito – Nitrogênio.

Variável	Efeito mosto doce	Efeito mosto amargo
Degrau proteolítico	2,4*	2,3*
Adjunto	-2,7*	-1,4*

Valores com (*) indicam que o efeito foi significativo para p<0,05.

Observa-se que os mostos C1 e C2 produzidos somente com malte de cevada, apresentaram maiores teores de nitrogênio total, 0,7 e 1%, respectivamente, indicando que a utilização de milho como adjunto promove redução do teor de compostos nitrogenados no meio. Tal redução é significativa estatisticamente, como indicam os resultados das análises de efeito apresentados na Tabela 18. Este fato pode ser explicado pela composição do milho, que apresenta teor de 9,8% de proteínas, o qual é inferior ao do malte, 10,5% (D'AVILA *et al*, 2012). Há de se mencionar que tal teor de proteínas considera o grão de milho inteiro. No presente trabalho foi utilizado milho processado (em forma de flocos), cujo teor de proteínas do lote, indicado pelo fabricante, foi de 5,6%, bem inferior. Vale notar, ainda, que a indústria cervejeira comumente utiliza o *grits* de milho como adjunto de processo

(AGRARIA, 2014), o qual é processado a partir do grão de milho, em que o cereal é condicionado com água a fim de facilitar a degerminação e posteriormente é moído de acordo com a especificação granulométrica desejada. Nesta condição, o *grits* apresenta em média 89% de massa seca, quantidade de lipídeos inferior a 1%, isento de impurezas, umidade menor que 13% e teor de proteínas de 8-9% (REINOLD, 1997).

KIRSOP (1982) menciona que mostos obtidos somente a partir do malte de cevada apresentam excesso de componentes nitrogenados, e que, geralmente, problemas relacionados à falta de nitrogênio são mais frequentes à medida que se aumenta a percentagem de substituição do malte por adjuntos amiláceos e, principalmente açucarado.

Também é possível observar que a execução do degrau proteolítico promoveu aumento do teor de nitrogênio total presente no mosto doce. O mosto C2 (1% N) com maior teor de nitrogênio que o mosto C1 (0,7% N), e o mosto C4 (0,6% N), com teor maior que o mosto C3 (0,5% N). A atuação de proteases durante a mostura promove maior liberação de aminoácidos, que são extraídos para a fração solúvel, enquanto que proteínas de elevada massa molar não hidrolisadas podem ficar retidas junto ao bagaço de malte, sendo retiradas do mosto. A Tabela 18 apresenta a avaliação estatística dos efeitos, cujo resultado indicou efeito significativo e positivo para o degrau proteolítico sobre o teor de nitrogênio no mosto.

Os mostos cervejeiros apresentam teores de proteínas em média de 5% (KUNZE, 1999). Dado isto, percebe-se que o mosto produzido somente com malte de cevada e sem degrau proteolítico (C1), obteve teor de proteína (4,4%) próximo a 5%. No entanto, o teor de proteínas foi maior (6,25%) para o caso do mosto (C2) passar pelo degrau proteolítico. No caso do mosto C1 (sem degrau proteolítico), o teor proteico foi menor devido à coagulação (*trub*) da grande quantidade de proteínas de elevada massa molar presente no mosto devido reduzida atuação das proteases. Os mostos C3 e C4, os quais são adicionados milho (teor de proteína baixo) na sua composição, apresentaram teor proteico reduzido de 3,12 e 3,75% respectivamente.

A quantidade e a forma de apresentação (aminoácidos, baixa, média e elevada massa molar) das fontes de nitrogênio no mosto apresentam efeito sobre

diversas características sensoriais da bebida. O teor adequado de aminoácidos e peptídeos, especificamente, favorece o metabolismo da levedura cervejeira, já que em baixa disponibilidade destes compostos, alterações metabólicas são observadas, resultando na geração de subprodutos indesejáveis na etapa de fermentação (BRIGGS *et al*, 2004).

Durante a cocção, embora haja uma concentração do mosto devido à perda de água, em geral, ocorre a redução do teor de nitrogênio total, pois proteínas de elevada massa molar tendem a perder água de solvatação, coagulando, além de sofrerem complexação entre si, com formação do chamado *trub* quente, insolúvel, que precipita e é removido (BARCHET, 1993). De modo geral, não houve alteração do teor de nitrogênio total entre os respectivos mostos doces e amargos de cada formulação de mosto avaliada.

5.5. Avaliação da atividade antioxidante

Na Tabela 19, estão representados os valores das médias das triplicatas das amostras de mosto amargo, referente à atividade antioxidante (AA%), determinada pelo método DPPH, para cada uma das concentrações escolhidas para efetuar o cálculo de IC_{50}, cujos resultados são apresentados na Tabela 20.

Tabela 19 - Atividade antioxidante (%) de amostras de mosto amargo.

Amostra de mosto amargo	AA%				
	10µl/ml	25µl/ml	50µl/ml	75µl/ml	100µl/ml
C1	41,7	44,5	51,1	61,1	66,1
C2	43,3	46,2	49,9	63,9	67,6
C3	39,7	42,9	41,9	52,2	56,8
C4	43,0	45,1	54,1	57,3	61,7

Tabela 20 - Atividade antioxidante (IC50) de amostras de mosto amargo.

Amostra de mosto amargo	IC_{50} (mg/l)	Desvio padrão
C1	43,7	0,5
C2	37,4	0,6
C3	63,7	0,7
C4	41,7	0,5

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo agente antioxidante; e a concentração de agente antioxidante

necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada “concentração eficiente”, também chamada de “concentração inibitória” (IC_{50}) (SOUSA *et al*, 2007). Desta maneira, as amostras que apresentam maior concentração inibitória (IC_{50}) são as que possuem menor capacidade sequestrante de radicais quando comparadas às outras amostras.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 20, pode-se observar que a amostra de mosto amargo com maior concentração efetiva necessária para sequestrar 50% dos radicais livres, em miligrama por litro de mosto, foi o mosto C3 (63,7 mg/l) e a que apresentou a menor concentração foi o mosto amargo C2 (37,4 mg/l).

Percebe-se que o degrau proteolítico é relevante na atividade antioxidante, já que o mosto C2, o qual obteve menor IC_{50} e maior teor de compostos fenólicos, teve maior poder antioxidante. Isto é explicado pelo maior tempo de contato do cereal com o mosto, aumentando a extração de compostos favoráveis ao acréscimo da atividade antioxidante. Por outro lado, apesar de o degrau proteolítico ser positivo ao aumento da atividade antioxidante do mosto, podemos constatar que a introdução do milho como adjunto promove sua redução. Isto é explicado pela redução da quantidade de malte de cevada (cereal que contem casca rica em compostos fenólicos) adicionada para preparo do mosto; e, além disso, o milho é pobre em compostos de atividade antioxidante (GONZALEZ SAN JOSÉ, MUNIZ e VALL BELLÉS, 2001).

A cerveja é uma bebida que contém muitos componentes, entre eles: acido fólico, vitaminas do complexo B (B1, B2, B12) e polifenóis, que são elementos conhecidos como antioxidantes naturais, provenientes do malte e do lúpulo. Dado isto, e comparando com os resultados de atividade antioxidante aos de compostos fenólicos totais, pode-se dizer que a amostra do mosto amargo C2, que apresentou o maior teor de compostos fenólicos (654 mg GAE/l), foi a que apresentou maior capacidade antioxidante. Isto ocorre pelo fato de uma grande quantidade de ácidos fenólicos presentes na amostra atuarem como agentes antioxidantes. Esta alta concentração de fenólicos e a elevada atividade antioxidante são devidas à produção do mosto C2 ser preparada apenas com malte de cevada, que tem altas concentrações destes compostos em sua casca. Já o mosto C3, que apresentou o

maior IC_{50} (63,5 mg/l), portanto, menor atividade antioxidante, teve em sua formulação de preparo do mosto uma proporção de 45% de milho como adjunto, o qual diminui o teor de compostos fenólicos dos mostos, visto que o adjunto é pobre em composto fenólico e consequentemente reduz a atividade antioxidante do mosto.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Todos os mostos obtidos, sejam com presença ou ausência de degrau proteolítico, ou com adição ou não de adjunto (milho), podem gerar cervejas classificadas como “forte”, pela legislação brasileira, devido ao elevado extrato primitiva;
- O degrau proteolítico teve efeito positivo sobre o extrato primitivo e o teor de ART, a cor, o teor de nitrogênio total, e sobre o teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante dos mostos doces e amargos;
- A introdução de milho como adjunto amiláceo com redução da carga de malte de cevada promoveu redução da cor, do teor de nitrogênio total, do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante dos mostos produzidos.

7. SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos no atual trabalho permitem estabelecer novas estratégias para o desenvolvimento de pesquisas futuras, como por exemplo:

- Explorar o processo com fermentação alcoólica e determinar as variáveis relevantes desta etapa, como: Atenuação, teor alcoólico, cor, retenção da espuma, turbidez, dióxido de carbono;
- Realização da análise sensorial das cervejas produzidas com e sem adjunto/ com e sem degrau proteolítico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

AGRARIA, 2014. Disponível em:<http://www.agraria.com.br/grits_flakes_produtos.php>. Acesso em 13/junho/2018

ALESSI, M. O.; RAUPP, D. S.; GARDINGO, J. R. **Caracterização do processamento da farinha de milho biju para o aproveitamento dos subprodutos.** Ci. Agr. Eng. UEPG. Ponta Grossa. 2003

AIZEMBER, R; **Emprego do caldo de cana e do melado como adjunto de malte de cevada na produção de cervejas**. USP. Lorena. 2015

ALMAGUER, C. SCHÖNBERGER, C. GASTL, M. ARENDT, EK. BECKER T**. Humulus lupulus– a story that begs to be told**. A review. Journal of the Institute of Brewing. 2014; 120(4):289-314. 11.

BAMFORTH, C. W**. "Malting technology and the uses of malt**" in MACGREGOR, A. W (org). Barley chemistry and technology, Minnesota, Usa: American Association Of Cereal Chemists, Inc., 1993.

BARCHET, R. Cold Trub: Implications for finished beer and methods of removal. **Brewing Techniques**, v.2, n.2. 1994.

BARTŁOMIEJ, S., JUSTYNA, R.K., EWA, N. **Bioactive compounds in cereal grains–occurrence, structure, technological significance and nutritional benefits**–a review. Food Sci Technol Int, 18 (2012), pp. 559-568

BIENDL, M.; ENGELHARD, B.; FORSTER, A.; GAHR, A.; LUTZ, A.; MITTER, W.; SCHMIDT, R.; SCHONBERGER.; **Hops. Their cultivation, composition and usage.** 1º Ed. Nuremberg: Fachverlag Hans Carl 2014. 336p

BRIGGS, D, E.; BOULTON, C, A.; BROOKES, P, A.; STEVENS, R.; **Brewing, science and practice.** Woodhead Publishing Limited. Cambridge England. 2004.

BISQUERRA, R.; **Introdução à estatística**. Porto Alegre; Artmed. 2004.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing:**yeast and fermentation. 1°. Ed. London: Wiley-Blackwell, v. 1, 2006. 656 p.

BRASIL. Decreto n. 2.314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Boletim IOB, São Paulo, n. 38, p. 11-30, 1997.

CARAVALHO, D. S; ZAMBIAZI, R. C; **Avaliação do processo fermentativo de cerveja pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomycescerevisae***. Alim. Nutr., Araraquarav. 22, n. 3, p. 351-357, jul./set. 2011

CARVALHO, L.G.; **Dossiê Técnico: Produção de Cerveja**. Rio de Janeiro, REDETEC Rede Tecnológica do Rio de Janeiro, 54 p. 2007.

CEREDA, M.P. Cervejas. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. **Alimentos ebebidas produzidos por fermentação**. São Paulo, Edgar Blucher, p.3-78, 1983.

CIACCO, C. F.; CRUZ, R. **Fabricação do amido e sua utilização**. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, 1982.

CURI, R.A; **Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte**. Botucatu, SP. Tese de Doutorado. USP. 2009.

D'AVILA, R.F. *et al*. **Adjuntos utilizados para produção de cerveja:características e aplicações**, Pelotas, Dez 2012. 60-68

DEÁK, T. **Handbook of food spoilage yeasts**. Boca Raton, Florida: CRC Press Taylor e Francis, 2008. P. 131-132

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S, I.; SILVA, J, B, A.; **Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade**. Ciênc.Tecnol.Aliment., Campinas, 27(supl.): 37-40, ago. 2007.

FREITAS, G.L.; KUSKOSKI, E.M.; GONZAGA, L.;FETT, R**. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH**. Alimentos e nutrição Araraquara. Brazilianoffoodandnutrition, v.17, p.303-307. São Paulo. 2006.

GHISELLI, A.; NATELLA, F.; GUIDI, A.; MONTANARI, L.; FANTOZZI, P.; SCACCINI, C. **Beer increases plasma antioxidant capacity in humans**. J.Nutr.Biochem., v. 11, p. 76-80, 2000

GONÇALVES, R. A.; SANTOS, J. P.; TOMÉ, P. H. F.; PEREIRA, R. G. F. A.; ASCHERI, J. L. R.; ABREU, C. M. P. **Rendimento e composição química de cultivares de milho em moagem a seco e produção de grits**. Ciência Agrotecnológica, Lavras, v. 27, n. 3, p. 643-650, 2003.

GONZALEZ SAN JOSÉ,M.L.;MUNIZ RODRIGUEZ, P.; VALL BELLÉS, Y. V. **Actividad antioxidante de lacerveza: estúdios in vitro e in vivo**. Cervejza e salud, v. 154, p.47-54, 2001.

HAAS, G. J.; BARSOUMIAN, R. **Antimicrobial activity of hops resins**. Journal of Food Protection, v. 57, p. 58-60, 1994.

HARDWICK, W. A.; ***Handbook of brewing***. New York: Marcel Dekker, 1995. 714p.

HU, S.; DONG, J.; FAN, W.; YU, J.; YIN, H.; HUANG, S.; LIU, J.; HUANG, S.; ZHANG, X.; **The influence of proteolytic and cytolytic enzymes on starch degradation during mashing.** Institute of brewing and distilling 120: 379–384, 2014.

HUTKINS, R. W. **Microbiology and technology of fermented foods**. IFT Press, Blackwell Publishing, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz**. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 4º ed. Brasília, 2005.

JANG, J.K; PYUN, Y.R. **Starch**, 1996.

JONES, M.; PIERCE, J**.; Somes factors influencing the individual amino acid composition of wort.** Proc. Am. Soc. Brew. Chem., v.22, p.130-136, 1964

KAVALIER, A. R.; LITT, A. M. C.; PITRA, N. J., COLES, M. C.; KENNELLY, E. J. *et al*. **Phytochemical and morphological characterization of hop (Humulus lupulus L.) cones over five developmental stages using high performance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry, ultrahigh performance liquid chromatography photodiode array detection, and light microscopy techniques**. Journal of agricultural and food chemistry. 2011; 59(9):4783-93.

KEUKELEIRE, D. **Fundamentals of beer and hop chemistry**.Quím.Nova, v.23, n.1, p. 108-112, 2000.

KIRSOP, B. H.; **Developments in beer fermentation.Top.Enzyme Ferment.Biotechnol.**, v.6, p.79-131, 1982.

KOLJONEM, T., HAMALAINEM, J. J., SJOHOLM, K., PIETILA, K. (1995). **A model for the prediction of fermentable sugar concentrations during mashing**. Journal of Food Engineering, 26, 329–350.

LATTANZIO, V. LATTANZIO, V.M., CARDINALI, A. **Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects**. Phytochemistry: advances in research, Research Signpost, Kerala (2006)

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. 2º ed. Aspen Publishers Inc, 2001.

LIMBERGER, V.M.; FRANCISCO, A.; BORGES, M.R.; ORO, T.; OGLIARI, P.J.; SCHEUER,P.M.; NORONHA, C.M. **Extração de b-glucanas de cevada e caracterização parcial do amido residual**. Ciência rural, Santa maria. 2011.

LINDENAU, J. D.R.; GUIMARAES, L. S. P. **Calculando o tamanho de efeito no SPSS.** Revista HCPA. UFRGS. 2012

MATHIAS, T. R. S.; SERVULO, E. F C. **Aproveitamento biotecnológico de resíduos industriais cervejeiros.** Tese de doutorado. UFRJ. 2015.

MORESSI, M., CIMINI, A., **Beer Clarification Using Ceramic Tubular Membranes.**2014.Food Bioprocess Technology, 7:2694–2710.

MELNIKOV, G.M.D. 2007. **Fermentação Primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte**. São Paulo, SP. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MEILGAARD, M. Wort Composition. In: BRODERICK, H.M. (Ed**.). The practical brewer: a manual for the brewing industry**. 2º ed. Madison: Impressions, 1978.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja. Larousse do Brasil**. 1º ed, São Paulo, 2011.

NIEROP, S., EVANS, D, E., AXCELL, B, C., CANTRELL, I, C., RAUTENBACH,M**. Impact of Different Wort Boiling Temperatures on the Beer Foam Stabilizing Properties of Lipid Transfer Protein 1.** Journal of agricultural and food chemistry. 52pág. 2004.

NOGUEIRA, A. R. A.; SOUZA, G. B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

OLIVEIRA, A. M. de. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja.** 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

PARAGINSKI, R. T.; TALHAMENTO, A.; OLIVEIRA, M.; ELIAS, M.C.; **Efeitos da temperatura nas alterações do teor de compostos com potencial antioxidante em grãos de milho durante o armazenamento.** Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, Campina Grande, v.17, n.2, p.159-167, 2015.

PERPETE, P.; COLLIN, S. **How to improve the enzymatic wort flavor reduction in a cold contact fermentation**. FoodChemistry, 2000.

PETKOWICS, C. L. O.; Bioquímica: **Aulas Práticas/ Universidade Federal do Paraná**. 7 ed. Curitiba: Editora UFPR. 2007.

PIAZZON, A.; FORTE, M.; NARDINI. M**. Characterization of Phenolics Content and Antioxidant Activity of Different Beer Types**. J. Agric. Food Chem. 2010.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of Brewing**. 2º ed. Florida: CRC Press and Taylor & Francis Group, 2006.

RAMÍREZ, J, E., CARRILLO, E, P,.SALDÍVAR, S, O. **Maltose and glucose utilization during fermentation of barley and sorghum lager beers as affected by b-amylase or amyloglucosidase addition.** Journal of cereal science. 602-609pág. 2014.

REINOLD, M.R**.. Manual Prático de Cervejaria**. São Paulo, Aden Editora. 1997.

ROCHA, R. F. R. M.; **Monitorização de parâmetros físico-químicos do grão de cevada/malte ao longo do processo de maltagem**. Dissertação de mestrado (Mestrado em química). Faculdade de ciências, Universidade do Porto. Porto, p. 73. 2014

RODRIGUES, M. A.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P.;**O lúpulo:** da cultura ao extrato. Técnica cultural tradicional. Instituto politécnico de Bragança. 2015.

SANTOS, S. P.; **Os primórdios da cerveja no Brasil**. 2º ed. Cotia: Ateliê Editorial, 2004.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos (métodos químicos e biológicos).** 2º ed. Viçosa: UFV,1990.

SICOBE - **Sistema de Controle de Produção de Bebidas**. 2012.

STEINER, E.; AUER, A.; BECKER.B.; GASTL. M. **Comparison of beer quality attributes between beers brewed with 100% barley malt and 100% barley raw material**. Journal of Science of Food Agriculture 2012.

SLEIMAN, M.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C; NOJIMOTO, T. 2010. **Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica.** Ciência e Agrotecnologia. 163-172p.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e Cervejarias: A história, a arte e a tecnologia**. Editora Aden, São Paulo, 2001.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P..**Bebidas:** Tecnología, Química e Microbiologia. Zaragoza, Editorial Acribia S.A., 487 p. (Série Alimentos Básicos 2). 1997.

ANEXO 1

APÊNDICE A – ANÁLISE ESTATÍSTICA *t* DE STUDENT

Nesta sessão, fez-se teste estatístico t de student (Teste de hipótese) para confirmação e melhor compreensão de resultados avaliados anteriormente.

O teste t *student* é o método mais utilizado para avaliação de diferenças entre médias entre dois grupos. As hipóteses a serem testadas são:

$H_{0:}$ a média da amostra é igual à média da referência

H_1: a média da amostra é diferente à média da referência

5.6.1. Cor do mosto (EBC)

Quadro 5 - Estatística t student para cor do mosto: C1/C3(amostra mosto doce sem degrau proteolítico).

	Cor do mosto doce
Média	8,5
Variância	1,75
Gl	2
Stat t	3,7811
t crítico uni	2,1318
t crítico bi	2,77

t crítico < Stat t

Quadro 6 - Estatística t student para cor do mosto: C2/C4(amostra mosto doce com degrau proteolítico).

	Cor do mosto doce
Média	11,16667
Variância	2,08333
Gl	4
Stat t	5,1537
t crítico uni	2,1318
t crítico bi	2,776445

Quadro 7 - Estatísitca t student para cor do mosto: C1/C3(amostra mosto amargo sem degrau proteolítico).

	Cor do mosto amargo
Média	20
Variância	1
Gl	2
Stat t	18,0277
t crítico uni	2,1318
t crítico bi	2,7764

Quadro 8 - Estatísitca t student para cor do mosto: C2/C4(amostra mosto amargo com degrau proteolítico).

	Cor do mosto amargo
Média	20
Variância	1
Gl	2
Stat t	18,0277
t crítico uni	2,1318
t crítico bi	2,7764

t crítico < Stat t

5.6.2. Açúcares redutores totais

Quadro 9 - Estatística t student para açúcares redutores (DNS) - C1/C3(amostra mosto doce sem degrau proteolítico).

	ART
Média	17,7
Variância	0,09
Gl	2
Stat t	-1,889
t crítico uni	2,919986
t crítico bi	4,302653

Quadro 10 – Estatística t student para açúcares redutores totais C2/C4(amostra mosto doce com degrau proteolítico). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada)

	ART
Média	19,5666
Variância	0,300333
Gl	4
Stat t	0,4724
t crítico uni	2,131847
t crítico bi	2,776445

Quadro 11 – Estatística t student para açúcares redutores totais C1-C3/C2-C4(amostra mosto doce). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada).

	ART
Média	17,84447
Variância	0,1141
Gl	10
Stat t	-8,28727
t crítico uni	1,812461
t crítico bi	2,228139

Quadro 12 - Estatística t student para açúcares redutores totais C1-C3/C2-C4(amostra mosto amargo). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada).

	ART
Média	35,2
Variância	0,784
Gl	10
Stat t	-3,90779
t crítico uni	1,812461
t crítico bi	2,228139

A adição do adjunto amiláceo não interfere nos ART's (t crítico>Stat t). Neste caso, a escolha da adição do adjunto tem por objetivo baratear custo de produção, resultando numa relação de açúcares satisfatória para se iniciar a fermentação alcoólica. Entretanto, verificou-se pelas estatísticas dos dados que o degrau proteolítico tem influencia no fornecimento de ART para o mosto (t crítico<Stat t). Neste caso confirmamos que a proteólise faz com que a camada externa de proteínas (aleurona) que envolve o endosperma, seja consumida, liberando carboidratos de baixo peso molecular e/ou aminoácidos para o meio.

5.6.3. Fenólicos totais

Quadro 13 – Estatística t student para fenólicos totais C1/C3 (amostra mosto doce). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada).

	fenólicos
Média	252,09
Variância	627,3318
Gl	4
Stat t	4,6913
t crítico uni	2,131847
t crítico bi	2,776445

Quadro 14 - Estatística t student para fenólicos totais C2/C4(amostra mosto doce com degrau proteolítico). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada).

	fenólicos
Média	252,09
Variância	627,3318
Gl	4
Stat t	4,6913
t crítico uni	2,131847
t crítico bi	2,776445

Quadro 15 - Estatística t student para fenólicos - C1/C3(amostra mosto amargo sem degrau proteolítico).

	fenólicos
Média	475,5967
Variância	14447,65
Gl	4
Stat t	2,558171
t crítico uni	2,131847
t crítico bi	2,776445

Quadro 16 - Estatística t student para fenólicos totais C2/C4(amostra mosto amargo com degrau proteolítico). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada).

	Fenólicos
Média	475,5967
Variância	14447,65
Gl	4
Stat t	2,558171
t crítico uni	2,131847
t crítico bi	2,776445

5.6.4. Nitrogênio total

Quadro 17 - Estatística t student para nitrogênio total C1/C3 (amostra mosto doce). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada).

	Nitrogênio
Média	5,003659
Variância	0,016732
Gl	4
Stat t	7,905694
t crítico uni	2,131847
t crítico bi	2,776445

Quadro 18 - Estatística t student para nitrogênio total C2/C4(amostra mosto doce com degrau proteolítico). t crítico<Stat t, há diferença entre as médias (H0rejeitada).

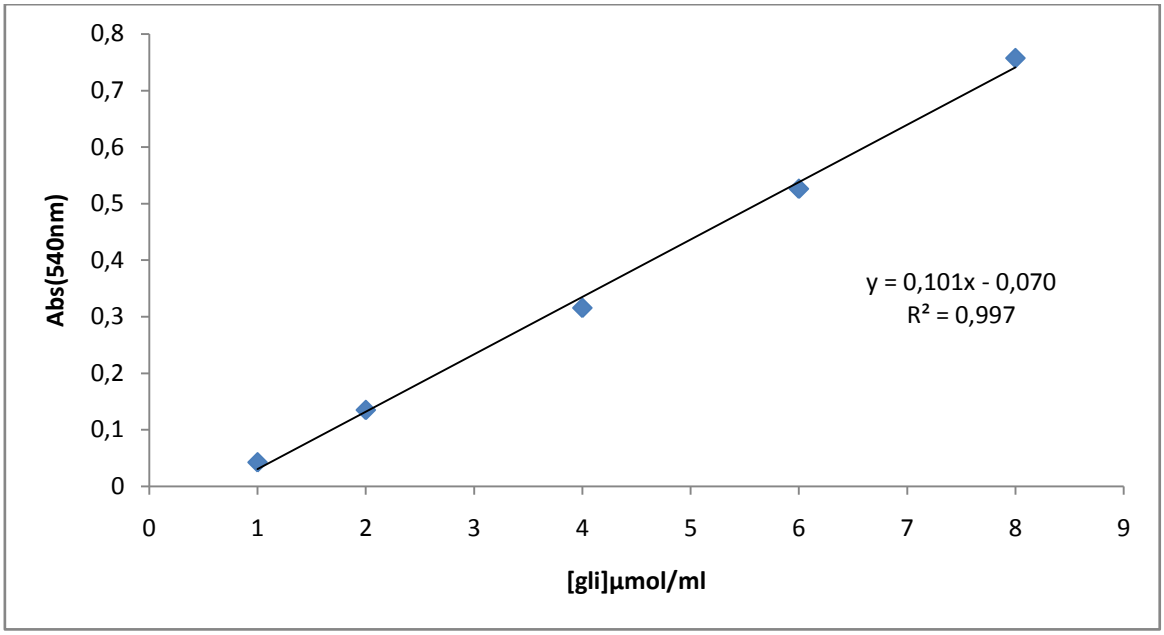
	Nitrogênio
Média	7,169422
Variância	3,814889
Gl	4
Stat t	2,431309
t crítico uni	2,131846
t crítico bi	2,776445

O conteúdo de nitrogênio no mosto doce está intrinsicamente relacionado ao perfil de mosturação e no tipo de adjunto utilizado, neste caso o milho, o qual tem conteúdo reduzido de proteínas em sua composição. Grande parte do fornecimento

de compostos nitrogenados vem do cereal maltado, tal fato explica e fortalece o motivo da utilização da cevada para produção de cerveja. Este é um cereal rico em amido e compostos nitrogenados.

APÊNDICE B – CURVAS PADRÃO DAS ANÁLISES QUÍMICAS

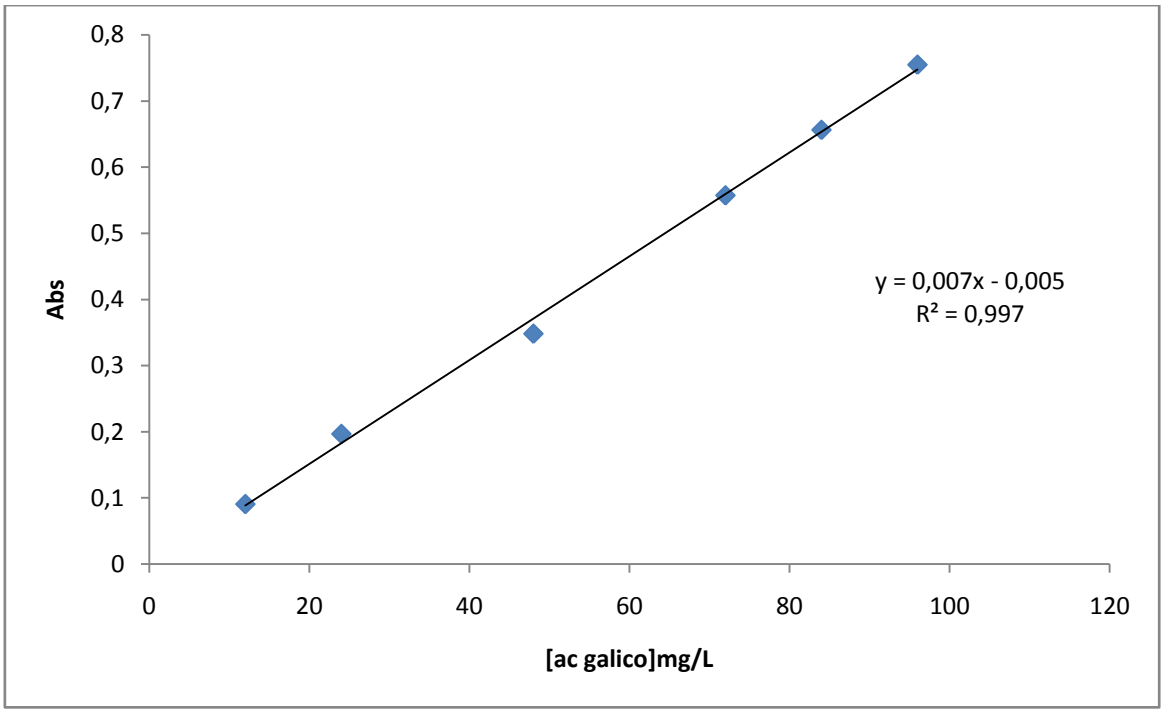
- Açúcares redutores



O coeficiente de correlação (R) obtido foi 0,9986, indicando a existência de uma relação linear entre as variáveis de concentração e absorbância. O coeficiente

de determinação (R^2=0,9972) mostra que 99,72% da variância em torno da média pode ser explicado pelo modelo apresentado.

- **Fenólicos totais**



O coeficiente de correlação (R) obtido foi 0,9988, indicando a existência de uma relação linear entre as variáveis de concentração e absorbância. O coeficiente

de determinação (R^2=0,9978) mostra que 99,78% da variância em torno da média pode ser explicado pelo modelo apresentado.

APÊNDICE C – FÓRMULAS PARA CÁLCULO DE CONCENTRAÇÃO

- Nitrogênio total e proteína bruta

$$\%N = \frac{V * N * f * meq\ N * 100}{m}$$

V – volume de ácido sulfúrico (0,1 mol/L; 0,2N) gastos na titulação**;**

N – normalidade do ácido

f – fator de correção do ácido (1,0082)

m = massa da amostra ou v = 9,0ml

$$\%P = \%N * f$$

f – 6,25