

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROPESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIA DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT

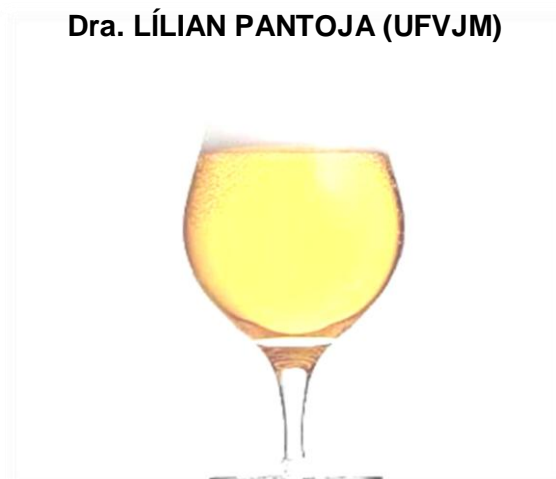
PATRICK GOMES DE SOUZA

**ELABORAÇÃO DE CERVEJAS TIPO LAGER A PARTIR DE
FARINHA DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes* Kunth) COMO
ADJUNTO, EM BIOPROCESSOS CONDUZIDOS COM
LEVEDURAS LIVRES E IMOBILIZADAS**

ORIENTADORES:

Dr. ADEMIR CASTRO E SILVA (UEA)

Dra. LÍLIAN PANTOJA (UFVJM)



Manaus – AM

2010

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS – UEA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA – PROESP
ESCOLA SUPERIOR DE CIÊNCIA DA SAÚDE – ESA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS - MBT

PATRICK GOMES DE SOUZA

**ELABORAÇÃO DE CERVEJAS TIPO LAGER A PARTIR DE
FARINHA DE PUPUNHA (*Bactris gasipaes* Kunth) COMO
ADJUNTO, EM BIOPROCESSOS CONDUZIDOS COM
LEVEDURAS LIVRES E IMOBILIZADAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Uso Sustentável da Biodiversidade

Orientador: Dr. Ademir Castro e Silva (UEA/INPA - AM)

Co-orientador: Dra. Lílian Pantoja (UFVJM - MG)

Colaboradores: Dr. Alexandre Soares dos Santos (UFVJM - MG)

Dr. João Batista de Almeida e Silva (EEL/USP – SP)

Manaus – AM

2010

PATRICK GOMES DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade do Estado do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração Uso sustentável da Biodiversidade.

Aprovado em _____ de junho de 2010

Profa. Dra. Lílian Pantoja (UFVJM-MG)
Orientador/Presidente

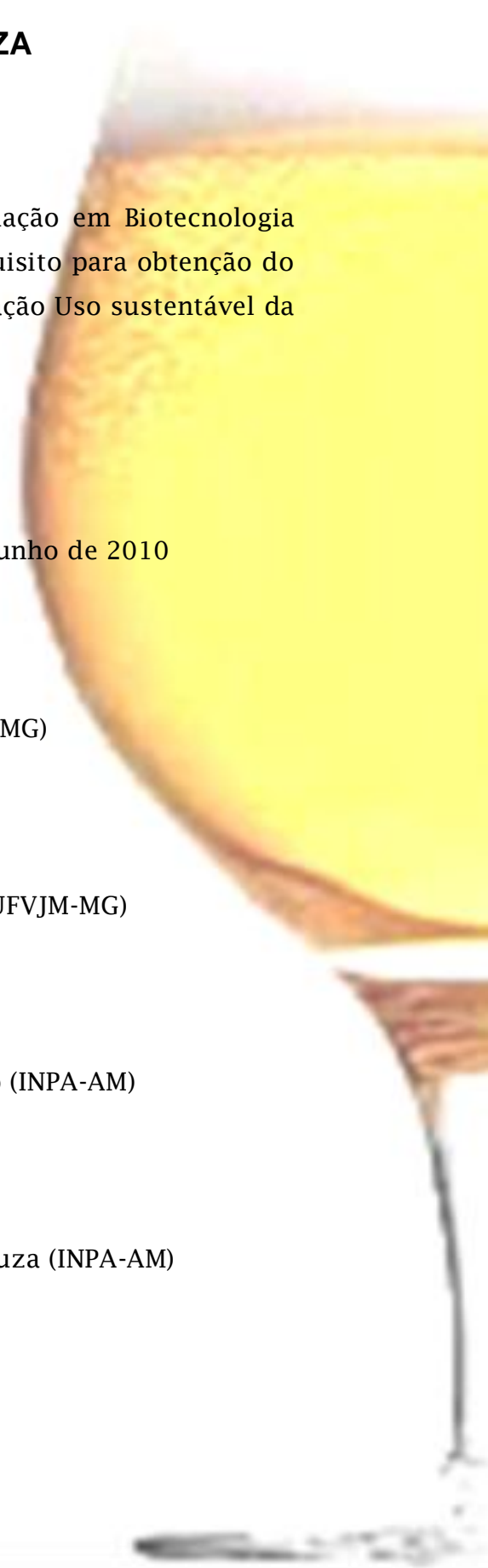
Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos (UFVJM-MG)
Membro da Banca

Profa. Dra. Helyde Albuquerque Marinho (INPA-AM)
Membro da Banca

Profa. Dra. Francisca das Chagas Amaral Souza (INPA-AM)
Membro da Banca

Manaus - AM

2010



Ficha Catalográfica

S729e Souza, Patrick Gomes de
Elaboração de cervejas tipo lager a partir de farinha de pupunha
(*Bactris gasipaes* kunth) como adjunto, em bioprocessos
conduzidos com leveduras livres imobilizadas. / Patrick Gomes de
Souza -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2010.
xvii, 95f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado
Amazonas - Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2010.
Orientador: Dr. Ademir Castro e Silva.

1. Bioquímica de alimentos 2.Farinha de pupunha 3.Cerveja I. Silva, Ademir
Castro e. II. Título.

CDU: 604

Ficha catalográfica elaborada por

Maria Eliana N. Silva – CRB- 11/248

“Uma paixão forte por qualquer objeto assegurará o sucesso, porque o desejo pelo objetivo mostrará os meios.” (William Hazlitt)

*“Este trabalho eu dedico a toda minha família
pela força e apoio durante toda minha vida acadêmica.
Em especial dedico em memória das minhas tias
Maria José de Souza Demonthenes e Dolores Ferreira de Souza
que hoje devem estar comemorando mais essa vitória em minha vida,
agora ao lado de Deus.”*

Resumo

SOUZA, Patrick Gomes de. Elaboração de cervejas tipo lager a partir de farinha de pupunha (*Bactris gasipaes* kunth) como adjunto, em bioprocessos conduzidos com leveduras livres e imobilizadas. Manaus: UEA, 195p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia).

A cerveja é uma bebida alcoólica obtida da fermentação do mosto cervejeiro, constituído de água, malte de cevada e lúpulo. Costumeiramente usam-se biomassas amiláceas como adjuntos para enriquecer o teor de carboidratos fermentáveis. O Brasil ocupa o quarto lugar no ranking mundial na produção de cerveja. Este trabalho propõe a produção de uma cerveja lager com características da Região Amazônica através do uso da farinha de pupunha, um fruto regional rico em amido, como adjunto em processo fermentativo com emprego de leveduras livres e imobilizadas. A farinha de pupunha, previamente caracterizada quanto a seus aspectos físico-químicos, foi submetida a cozimento para ser utilizada como adjunto no processo de elaboração do mosto cervejeiro. O processo de fermentação do mosto foi conduzido com leveduras cervejeiras livres e leveduras imobilizadas, em alginato de cálcio. O bioprocessos foi monitorado quanto à temperatura e aos aspectos físico-químicos. As cervejas foram caracterizadas quanto aos aspectos físico-químicos, microbiológicos e sensoriais, e apresentaram características de cerveja tipo Lager, sendo classificadas como cervejas alcoólicas, claras e comuns. As bebidas obtidas pelos dois processos de fermentação apresentaram boa qualidade microbiológica e sensorial, com aceitabilidade superior a 68 %. Os resultados obtidos permitiram concluir que a farinha de pupunha constitui-se em uma excelente fonte de carboidratos fermentáveis para elaboração de cerveja.

Palavras-chave: Farinha de pupunha - Leveduras imobilizadas – Cerveja

Comitê Orientador: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva – UEA (Orientador); Profa. Dra. Lílian Pantoja – UFVJM (Co-Orientadora); Prof. Dr. João Batista Almeida e Silva – EEL/USP (Colaborador); Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos - UFVJM (Colaborador).

Abstract

SOUZA, Patrick Gomes de. Obtaining a lager beer with the use of peach palm flour (*Bactris gasipaes* Kunth) as assistant and bioprocess conducted with free and immobilized yeast in calcium alginate. Manaus: UEA, 116.p. Dissertation (Master's Program in Biotechnology).

Beer is an alcoholic beverage obtained by fermentation of beer wort, consisting of water, barley malt and hops. Usually they use biomass as starchy adjuncts to enrich the content of fermentable carbohydrates. Brazil is fourth in world rankings in the production of beer. In this dissertation is proposed the production of a lager beer with characteristics of the Amazon region through the use of peach palm flour, a regional fruit rich in starch, as an adjunct in the fermentation process with the use of free and calcium alginate immobilized yeast. The peach palm flour, previously characterized as their physical-chemical aspects, was subjected to cooking to be used as an adjunct in the preparation process of brewing mash. The fermentation process the wine was carried out with free and immobilized in calcium alginate brewer's yeast. The bioprocess was monitored for temperature and physical-chemical parameters. The beers were characterized according to the physical-chemical, microbiological and sensory characteristics and showed Lager beer, being classified as alcoholic beers, clear and common. Beverages produced by the two fermentation processes showed good microbiological quality and sensory acceptability with more than 68%. The results showed that the peach palm flour is in an excellent source of fermentable carbohydrates for the preparation of beer.

Palavras-chave: peach palm flour, immobilized yeast , beer

Supervisor Committee: Prof. Dr. Ademir Castro e Silva – UEA (Supervisor); Profa. Dra. Lílian Pantoja – UFVJM (Co-advisor); Profa. Dr. João Batista Almeida e Silva – EEL/USP (Collaborator); Prof. Dr. Alexandre Soares dos Santos - UFVJM (Collaborator).

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	JUSTIFICATIVA	23
3.	OBJETIVOS	23
3.1.	GERAL	25
3.2.	ESPECÍFICOS E META	25
4.	REFERENCIAL TEÓRICO	27
4.1.	HISTÓRICO	27
4.2.	MERCADO CERVEJEIRO	29
4.3.	LEGISLAÇÃO CERVEJEIRA	31
	4.3.1. Identidade da cerveja	31
	4.3.2. Classificação da Cerveja	32
	4.3.2.1. Quanto ao Extrato Primitivo	32
	4.3.2.2. Quanto à Cor	33
	4.3.2.3. Quanto ao Teor Alcoólico	33
	4.3.2.4. Quanto a Proporção do Malte de Cevada	33
	4.3.2.5. Quanto à Fermentação	34
4.4.	MATÉRIAS-PRIMAS	34
	4.4.1. Água	34
	4.4.2. Malte de Cevada	35
	4.4.3. Lúpulo	36
	4.4.4. Adjunto	36
4.5.	PUPUNHA (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth)	37

4.6.	LEVEDURAS CERVEJEIRAS	38
4.7.	PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM ALGINATO	39
4.8.	PROCESSAMENTO DA CERVEJA	39
	4.8.1. Elaboração do mosto	40
	4.8.2. Fermentação	42
	4.8.2.1. Fermentação Aeróbica	43
	4.8.2.2. Fermentação Anaeróbica	43
	4.8.3. Maturação	44
	4.8.4. Filtração	44
	4.8.5. Envase da Cerveja	45
4.9.	FUNDAMENTOS ANALÍTICOS	45
	4.9.1. Contaminantes na Cerveja	45
	4.9.2. Composição Físico-química	46
	4.9.3. Qualidade Sensorial	48
5.	MATERIAL E MÉTODOS	51
5.1.	MATERIAL	51
5.2.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	52
5.3.	AQUISIÇÃO E BENEFICIAMENTO DO FRUTO	53
5.4.	OBTENÇÃO DA FARINHA DE PUPUNHA	54
5.5.	CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE PUPUNHA	55
	5.5.1. Rendimentos do Fruto	55
	5.5.2. Caracterização Físico-química	56
5.6.	PREPARO DAS BIOESFERAS	64
5.7.	ELABORAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO	64

5.8.	FERMENTAÇÃO DA CERVEJA	67
5.8.1.	Contagem de Células Vivas	68
5.8.2.	Monitoramento do Processo Fermentativo	69
5.8.3.	Variáveis de Resposta do Bioprocesso	70
5.9.	CERVEJA EM FINAL DE FERMENTAÇÃO	72
5.10.	MATURAÇÃO DA CERVEJA	72
5.11.	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA	72
5.11.1.	Caracterização Físico-química	72
5.11.2.	Avaliação Microbiológica	74
5.11.3.	Análise Sensorial	76
5.12.	ETAPA GERAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJAS	77
5.13.	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	79
5.14.	LABORATÓRIOS E INSTITUTOS	79
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
6.1.	PUPUNHA (<i>Bactris gasipaes</i> Kunth)	81
6.1.1.	Caracterização Física dos Frutos	81
6.1.2.	Rendimento em Polpa e em Farinha	81
6.1.3.	Características Físico-químicas da Farinha de Pupunha	82
6.2.	AVALIAÇÃO DO MALTE E DA FARINHA DE PUPUNHA	85
6.3.	MOSTO CERVEJEIRO	86
6.4.	IMOBILIZAÇÃO CELULAR E INÓCULO NO MOSTO	89
6.5.	FERMENTAÇÃO E MATURAÇÃO DA CERVEJA	91
6.6.	VARIÁVEIS DE RESPOSTA AO BIOPROCESSO	95
6.7.	QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA CERVEJA	96

6.8.	QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS CERVEJAS	100
6.9.	AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS BEBIDAS	100
7.	CONCLUSÃO	103
8.	SUGESTÕES	105
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Ranking mundial da produção em cerveja em 2010.	29
Figura 2.	<i>Ranking nacional de participação das cervejas no mercado, ano de 2006.</i>	31
Figura 3.	<i>Ranking mundial de produção de cerveja no ano de 2007 por grupo cervejeiro, ano de 2006.</i>	31
Figura 4.	<i>Frutos de pupunha (<u>Bactris gasipaes</u> Kunt) em cachos.</i>	37
Figura 5.	<i>Estrutura química plana das dicetonas vicinais. 2,3 – butanodiona (A) e 2,3 pentanodiona (B).</i>	48
Figura 6.	<i>Ingredientes utilizados para elaboração da cerveja: malte (A), farinha de pupunha (B), lúpulo (C), leveduras imobilizadas em alginato de cálcio (D) e leveduras livres (E).</i>	52
Figura 7.	<i>Delineamento experimental com as etapas resumidas do processo de produção da cerveja elaborada com farinha de pupunha e fermentada empregando leveduras livres e imobilizadas.</i>	53
Figura 8.	<i>Diferentes variedades de frutos de pupunha em cachos.</i>	53
Figura 9.	<i>Fluxograma de obtenção da farinha de pupunha.</i>	54
Figura 10.	<i>Polpa (A) e a farinha (B) de pupunha.</i>	55
Figura 11.	<i>Esquema do processo de imobilização celular para obtenção das bioesferas de alginato de cálcio (Fonte: PANTOJA, 2006).</i>	64
Figura 12.	<i>Moinho com um par de rolos (A) e malte moído (B).</i>	65
Figura 13.	<i>Tina de mostura (A), tina filtro (B) e cozinhador de mosto (C).</i>	65
Figura 14.	<i>Tanque fermentador com capacidade para 200 L.</i>	67
Figura 15.	<i>Desenho esquemático da câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem de células. Fonte: PANTOJA (2006).</i>	68

Figura 16.	<i>Aparelho Beer Analyser, utilizado para determinação do teor de extrato original e aparente, fermentabilidade e teor alcoólico da cerveja.</i>	69
Figura 17.	Ficha sensorial aplicada para as avaliações de preferência e aceitabilidade das cervejas tipo lager elaborada com farinha de pupunha como adjunto e conduzidas por processos fermentativos com leveduras livres e imobilizadas.	77
Figura 18.	<i>Fluxograma do processo de produção da cerveja de pupunha, utilizando leveduras imobilizadas, com suas respectivas etapas e análises.</i>	78
Figura 19.	<i>Laboratório e Institutos onde foram realizadas partes dos experimentos relacionados ao projeto de elaboração de cervejas tipo lager conduzidas com células livres e imobilizadas, utilizando como adjunto farinha de pupunha. Laboratorio de Alimentos e Nutrição - LAN/INPA (A); Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação - LBB/UFVJM (B), Micro Cervejaria - EEL/USP (C), Universidade do Estado do Amazonas – UEA (D).</i>	80
Figura 20.	<i>Malte avaliado durante o teste de parasita.</i>	86
Figura 21.	<i>Processo de mosturação com adjunto de farinha de pupunha, mostrando sólidos em suspensão que originaram o bagaço. Na figura o bagaço (pontos escuros) se diferencia do mosto pela sua coloração mais escura. Na parte central encontra-se a espuma formada durante a agitação do mosto.</i>	87
Figura 22.	<i>Bagaço retido no interior da tina filtro após etapa de filtração do mosto, formando o leite filtrante.</i>	88
Figura 23.	<i>Aspecto do mosto frio antes do processo fermentativo.</i>	89
Figura 24.	<i>Leveduras imobilizadas submersas no mosto antes de serem inoculadas no tanque fermentador.</i>	90
Figura 25.	<i>Leitura de células por microscopia em câmara de Neubauer para determinação do percentual de células vivas. Em destaque células mortas coradas por azul de metileno.</i>	90
Figura 26.	<i>Resíduos de células após centrifugação das cervejas oriundas de bioprocessos com células livres (A) e imobilizadas (B). Amostra coletada no início do processo de maturação.</i>	99

Figura 27. Aspecto das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzidas por bioprocessos com células livres (A) e imobilizadas em alginato de cálcio (B). 102

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	<i>Curva padrão de glicose 1 g.L⁻¹ para quantificação de açúcares</i>	60
Gráfico 2.	<i>Curva padrão de glicose 1 g.L⁻¹ para quantificação do teor de amido.</i>	62
Gráfico 3.	<i>Curva padrão de ácido gálico (GAE) utilizada para determinação de compostos fenólicos.</i>	63
Gráfico 4.	<i>Curva padrão de pirocatequina utilizada para determinação de flavonóides.</i>	63
Gráfico 5.	<i>Rampa de mostura.</i>	66
Gráfico 6.	<i>Curvas de temperaturas de mosturação e cozimento do adjunto de farinha de pupunha, com rampas e repousos.</i>	87
Gráfico 7.	<i>Temperaturas de fermentação e maturação da cerveja utilizando como adjunto farinha de pupunha conduzido por processo fermentativo com leveduras na forma livre.</i>	91
Gráfico 8.	<i>Temperaturas de fermentação e maturação da cerveja utilizando como adjunto farinha de pupunha conduzido por processo fermentativo com leveduras na forma imobilizada em alginato de cálcio.</i>	92
Gráfico 9.	<i>Percentual de fermentação do processo livre em função do tempo.</i>	93
Gráfico 10.	<i>Percentual de fermentação do processo imobilizado em função do tempo</i>	93
Gráfico 11.	<i>Variáveis do processo conduzido com leveduras livres relacionadas a temperatura, extrato aparente e álcool em função do tempo.</i>	94

Gráfico 12..	<i>Variáveis do processo conduzido com leveduras imobilizadas relacionadas a temperatura, extrato aparente e álcool em função do tempo.</i>	94
Gráfico 13.	Preferência das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto conduzidas por bioprocessos com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio.	101
Gráfico 14.	Resultados de Preferência das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto conduzidas por bioprocessos com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio quando comparadas com uma cerveja tradicional puro malte.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	<i>Rendimentos obtidos durante as etapas de processamento do fruto in natura em polpa; da polpa em farinha e rendimento total do fruto inteiro in natura em farinha.</i>	82
Tabela 2.	<i>Caracterização físico-química da farinha de pupunha (g.100g⁻¹).</i>	83
Tabela 3.	<i>Avaliação do malte e da farinha de pupunha.</i>	86
Tabela 4.	<i>Resultados da contagem de células vivas no início e final do processo fermentativo de obtenção das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzido com leveduras na forma livre e imobilizada.</i>	89
Tabela 5.	<i>Variáveis de resposta dos bioprocessos de elaboração de cerveja utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzidas por leveduras livres e imobilizadas em alginato de cálcio.</i>	96
Tabela 6.	<i>Composição físico-química das cervejas lager elaborada utilizando farinha de pupunha como adjunto conduzidas por processos fermentativos empregando levedura na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio.</i>	97
Tabela 7.	<i>Composição microbiológica após o processo de pasteurização das cervejas com adjunto de pupunha obtidas por leveduras livres e leveduras imobilizadas.</i>	100
Tabela 8.	<i>Média das notas e frequências de respostas das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzidas por bioprocessos com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio.</i>	102

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** *Atuação enzimática e condições ótimas de pH e temperatura* 41
(TSHOPE, 2001 *apud* SILVA, 2005).
- Quadro 2.** *Composição das soluções empregadas no método de Somogy- Nelson para determinação dos teores de açúcares.* 71

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a DEUS pelas oportunidades que surgiram em minha vida pessoal, profissional e acadêmica, pelos conhecimentos adquiridos e saúde.

À minha família minha mãe Márcia Souza, minha avó Icléa Souza, e irmã Priscila Souza, e as minhas tias Ane, Lene e Socorro, e as minhas primas Paula Mayara e Paula Nathalya pelo apoio, amor e formação. Por serem minha fortaleza e meu amparo em todos os momentos.

Um especial agradecimento ao Ricardo Macedo que me acompanhou em todas as etapas da realização desse projeto. Por sempre estar comigo me incentivando e contribuindo para meu crescimento. Pelo companheirismo e amizade.

Um agradecimento especial as minhas amigas/irmãs Márcia Castro, Daniely Pinheiro e Dannielle Cordeiro, amigas de graduação e mestrado, pela amizade e apoio em todos os momentos. Amo muito vocês.

Aos meus orientadores Dr. Ademir Castro e Silva e Dra. Lílian Pantoja pelos ensinamentos e por acreditarem no meu trabalho, em especial a Dra. Lílian por tudo que aprendi e continuo a aprender com seus ensinamentos, pelo carinho e dedicação constantes desde a Iniciação Científica.

Aos professores que colaboraram com a elaboração desse trabalho. Ao Dr. Alexandre L. Soares (UFVJM), ao Dr. João Batista A. Silva (EEL/USP) e a Dra. Helyde A. Marinho (INPA) por cederem seus laboratórios para realização do projeto, pelos ensinamentos que contribuíram muito com meu desenvolvimento, pelo apoio e dedicação.

Um agradecimento especial ao meu amigo e mestre cervejeiro Paulo Henrique Zavarize por todo o aprendizado que me concedeu sobre cerveja, pela confiança no meu trabalho e pelas oportunidades. Agradeço também a confiança e apoio sinceros da Gerente de Gente e Gestão, Sheila Simões, e Gerente Fabril, Henrique Martins, amigos da AmBev - Filial Manaus.

Aos meus amigos pessoais Renan Moraes, Mário Marinho, Marcia Pequeno, Mayson Macedo e Jussana Tavares por estarem sempre ao meu lado.

Agradeço imensamente aos meus amigos que sempre estiveram ao meu lado me ajudando durante esta caminhada: Francisca Aline, Francisco Santiago, Francisco Raimundo, João de Souza, José Evilásio Pereira, Mirela Furtado, Priscila Fontinelli, Raimundo Chaul, Rosenice Dias, Suzana Kamimura e Vicente de Paula.

Aos colegas dos laboratórios que desenvolvemos o projeto, D. Socorro Barreto, D. Léa Sicsu, D. Helena, Luciana e a Daniele Cordeiro (INPA), Ricardo Salviano e Alice Macedo (UFVJM), Cléber Tomazi, Giovani Brandão e Matheus (EEL-USP) pela ajuda tão indispensável amizade e apoio.

À FAPEAM pelo recurso financeiro destinado ao projeto e bolsa de estudo ao autor do projeto.

Às Universidades e Institutos que disponibilizaram seus profissionais e laboratórios a disposição da realização do projeto: Universidade do Estado do Amazonas (UEA), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFJVM), Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP) e Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

1. INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais conhecidas no mundo. No Brasil, o hábito de tomar cerveja foi trazido por D. João VI, no início do século XIX, durante a permanência da família real portuguesa em território brasileiro. Nessa época, a cerveja consumida era importada de países europeus (VENTURINI FILHO e CEREDA, 2001). O Brasil comporta a maior empresa cervejeira do mundo, a AmBev, que está inserida no grupo da AB InBev, o qual representa uma fatia significativa na produção no mercado mundial de cervejas.

No ano de 2001, o Brasil, estava entre os quatro maiores produtores mundiais de cerveja com uma produção anual de 8,4 bilhões de litros, perdendo apenas para os Estados Unidos, China e Alemanha. Apesar do Brasil está entre os maiores produtores de cerveja, o consumo *per capita* é de cerca de 50 Litros por habitante por ano, o qual o mantém em 34^o lugar no ranking que é liderado pela República Tcheca (156,9 Litros por habitante por ano), Irlanda e Alemanha (ALMEIDA e SILVA, 2005).

De acordo com o Decreto nº. 6871 de 4 de julho de 2009 do Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento (MAPA), que regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas, Art.

36, cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (BRASIL, 2010).

Na elaboração da cerveja também é permitido substituir parte do malte, até 45 % do valor do extrato original, por uma fonte de carboidratos, denominado adjunto, como milho, trigo e arroz. Estes adjuntos são utilizados na indústria cervejeira, devido à grande oferta e baixos custos no mercado.

Novas pesquisas vêm sendo desenvolvidas buscando novos adjuntos e técnicas que beneficiem as práticas da indústria cervejeira, tais como qualidade, rendimento em bebida (perda de extrato) e produtividade.

Dentre as pesquisas podemos citar os estudos que vem sendo realizados pela Escola de Engenharia de Lorena/USP, tais como, o uso do processo que utiliza o mosto mais concentrado, denominado High-Gravity (MELNIKOV, 2007; SILVA, 2005; ALMEIDA, 1999), células imobilizadas em suporte natural obtido a partir de bagaço de malte (SILVA, et al., 2008; MELNIKOV, 2007; BRANYIK et al. 2006) e também a busca de novos adjuntos como a banana (CARVALHO, 2007) e arroz preto (ANDRADE, 2007).

Uma alternativa possível ao uso destes adjuntos, como fonte amilácea. Outra fonte de amido que pode ser utilizada como adjunto é o fruto da pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), a pupunha.

A pupunha é considerada um alimento quase completo, pois contém razoável quantidade de proteína, óleo, caroteno, amido (CLEMENT, 1987), elementos minerais e vitaminas (BOHORQUEZ e YCAZA, 1988; CAVALCANTE, 1991). O fruto pode ser consumido logo após cozimento ou na forma de farinha.

O uso de novas tecnologias vem incrementar o mundo competitivo das bebidas alcoólicas fermentadas, dentre essas, podemos destacar o uso de leveduras cervejeiras imobilizadas em alginato de cálcio. O processo de imobilização consiste no aprisionamento de células cataliticamente ativas num sistema reacional que impede sua passagem para o meio (CANILHA et al., 2006; PANTOJA, 2006; DRAGONE et al., 2007) e pode influenciar de forma positiva nas características sensoriais e econômicas do produto.

Pesquisas realizadas nas últimas décadas encontraram soluções para muitos problemas do processo cervejeiro e como consequência, modernas cervejarias são hoje estruturadas com métodos e processos utilizando equipamentos especialmente idealizados (REINOLD, 1997).

2. JUSTIFICATIVA

O setor cervejeiro vem crescendo anualmente, pois a cerveja é um produto de excelente aceitabilidade, e está no topo dos produtos mais consumidos no país. No Brasil, a produção de cervejas tipo lager, especificamente a Pilsen, tem maior destaque no mercado, caracterizadas por sua suavidade e saboroma agradável.

A utilização de novos adjuntos com objetivo de baixar custos para elaboração da cerveja destaca-se entre as tecnologias mais estudadas. No Amazonas podem ser encontrados diversos frutos com alto teor de amido, sendo favorável seu emprego na indústria cervejeira. A pupunha é um fruto que possui boa aceitabilidade local e apresenta agradáveis características sensoriais, é abundante no estado e pode ser processado em farinha, tornando-o menos suscetível a atuação de microrganismos deteriorantes, além de facilitar seu armazenamento para posterior utilização. A forma de manejo da farinha é mais viável para as indústrias cervejeiras, pois seu armazenamento pode ser feito em silos, sendo conduzidos aos tanques de processamento através de transportes mecânicos, seguido de canecas de plástico. O uso de farinha de pupunha como adjunto para obtenção de cerveja introduzirá no mercado um produto com características de sabor e aroma amazônicos, além

de contribuir para a redução de perdas pós-colheita, uma vez que o fruto é altamente perecível e contribuirá para a melhoria de renda na Região pela geração de novos empregos e inserção de um novo produto no mercado

A condução do processo fermentativo por meio de leveduras imobilizadas, por ser uma técnica já estabelecida, nos últimos anos, vem sendo bastante estudada na produção de bebidas alcoólicas (OLIVEIRA, 2010; PANTOJA, 2009; DRAGONE et al., 2007; CANILHA et al., 2006; PANTOJA, 2006). Esse processo representa uma das inovações tecnológicas mais promissoras para indústria de bebidas, pois aumenta a produtividade uma vez que o processo de filtração e limpeza dos tanques se torna mais ágil; possui baixo custo, apresentando vantagens relacionadas ao rendimento do produto final e influencia nas características de sabor e aroma.

A cerveja elaborada utilizando farinha de pupunha como adjunto apresenta como principais finalidades, agregar valor a um fruto regional de boa aceitabilidade; utilizar uma matéria-prima de baixo custo, alta produção, rica em amido, de fácil processamento e armazenamento; empregar o processo de imobilização celular visando contribuir para a melhoria da qualidade do processo, da cerveja e do rendimento em bebida, minimizando perdas.

Dentro deste contexto os objetivos deste estudo estão apresentados na página a seguir.

3. OBJETIVOS E METAS

3.1. GERAL

Elaborar cervejas lager empregando bioprocesso com leveduras livres e imobilizadas, utilizando farinha de pupunha como fonte secundária de carboidratos fermentescíveis.

3.2. ESPECÍFICOS E METAS

3.2.1. Caracterizar a farinha de pupunha quanto aos aspectos físico-químicos.

META: Determinar a composição da matéria-prima utilizada como adjuntos por meio de 18 análises físico-químicas, realizadas em triplicata perfazendo um total de 54 análises.

3.2.2. Avaliar a qualidade da farinha de pupunha e grão de malte.

META: Conhecer a qualidade da farinha de pupunha e do malte quanto a presença de materiais estranhos, impurezas, bolor e qualidade morfológica dos grãos. Perfazendo um total de 12 análises.

3.2.3. Elaborar cerveja lager por meio de processo fermentativo em batelada com leveduras imobilizadas.

META: Obter cerveja utilizando como agente fermentativo leveduras na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio, bem como avaliar o desempenho fermentativo do bioprocesso por meio de cinco análises em triplicata perfazendo um total de 15 análises.

3.2.4. Monitorar o processo fermentativo por meio de análises físico-químicas.

META: Acompanhar as características físico-químicas por meio de cinco análises realizadas em triplicata de acordo com o tempo de fermentação.

3.2.5. Avaliar as características físico-químicas e microbiológicas da cerveja.

META: Caracterizar a bebida por meio de nove análises físico-químicas e três análises microbiológicas, todas realizadas em triplicata, totalizando 36 análises.

3.2.5. Avaliar as características sensoriais da cerveja.

META: Definir as características sensoriais das bebidas por meio de testes de preferência e aceitabilidade, com a participação de no mínimo 35 provadores.

4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1. HISTÓRICO

Não se sabe ao certo quando ou onde surgiram as primeiras cervejas, no entanto, acredita-se que sua origem se deu na região da mesopotâmia por volta de 6.000 anos a.C. (ALMEIDA E SILVA, 2005). A bebida foi desenvolvida paralelamente aos processos de produção de cereais e difundiu-se lado a lado com as culturas de centeio e cevada, a partir do momento que os homens deixaram a vida nômade para se estabelecerem nas antigas sociedades estáveis. Há evidências do consumo de cerveja por civilizações como a suméria, babilônica e a egípcia, onde o consumo da bebida alcançava todas as classes sociais e ocupava lugar importante nos ritos religiosos (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA, 2010).

A produção da cerveja pelos sumérios, a exemplo dos egípcios, era muito rudimentar. O processo cervejeiro era exercido por padeiros devido à natureza da matéria-prima, como grãos de cereais e leveduras. A cerveja era deixada de molho até germinar e então moída grosseiramente, moldada em bolos aos quais se adicionava a levedura. Os bolos, após parcialmente assados e desfeitos, eram colocados em jarra com água e deixados fermentar.

A cerveja também teve grande importância nas civilizações assíria e babilônica, sendo que os assírios tinham legislação a respeito do código *Hamurabi* (considerada a primeira legislação da humanidade) regulamentando a fabricação e comercialização do produto. Os egípcios fizeram com que a cerveja ficasse conhecida pelos outros povos orientais, posteriormente pelos povos europeus e a partir deles, para o resto do mundo.

Apesar de ser considerada menos importante que o vinho, a cerveja evoluiu durante o período grego e romano. Ao contrário do vinho, considerado a bebida dos deuses e consumido pelas classes sociais mais abastadas, a cerveja era consumida pelas classes sociais menos favorecidas, sendo muito apreciada em regiões sob domínio do império romano, principalmente germanos e gauleses. Por esse motivo os romanos as consideravam desprezíveis e típicas de povos bárbaros. Os romanos associavam a cerveja à deusa Ceres, deusa da agricultura e da fertilidade, a partir daí surgiu a palavra “cerveja” originada da palavra latina *cervisia* ou *cerevisia*. A palavra “cereal” também surgiu a partir do nome da deusa Ceres.

Durante a idade média, o lúpulo, considerado, atualmente, matéria-prima essencial para a produção da cerveja (ALMEIDA E SILVA, 2005), foi acrescentado à cerveja como matéria-prima e a bebida passou a ser produzida em maiores escalas, principalmente nos mosteiros. Até praticamente ao fim da Idade Média, a cerveja europeia era elaborada com todo o tipo de ingredientes entre aromatizantes e plantas silvestres. Assim, em 1516, o Duque Guilherme IV da Bavária, criou a, até hoje conhecida, “lei *Reinheitsgebot*” ou lei da pureza, que determinava que a cerveja deveria ser produzida somente a partir da cevada, lúpulo e água (TSCHOPE, 2001).

Em Portugal, há notícias da existência de uma fábrica de cerveja em Lisboa de 1689, contudo, nessa época, a produção de cerveja competia com a produção de vinhos, muito mais popular entre os portugueses. A partir dos portugueses a cerveja chegou ao Brasil. Os primeiros documentos que fazem referência da bebida no país datam do século XVII. No entanto, o hábito de consumir cerveja foi trazido por D. João VI, no século XIX, durante a permanência da família real portuguesa no Brasil. Nessa época, a bebida

consumida era importada de países europeus, sobretudo da Inglaterra (VENTURINI FILHO e CEREDA, 2001).

O primeiro registro da produção nacional de cerveja data do ano de 1836, no Rio de Janeiro. Mais tarde, em 1888, foi fundada na cidade do Rio de Janeiro a “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia.” e poucos anos depois, em 1891 na cidade de São Paulo, a “Companhia Antártica Paulista”.

Na Primeira Guerra Mundial, a importação de cervejas, principalmente européias, caiu muito, fazendo com que a produção nacional se mantivesse em níveis bastante elevados. A partir daí o setor cervejeiro se consolidou no país, se tornando um negócio em ligeira expansão. Hoje a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil.

4.2. MERCADO CERVEJEIRO

O mercado cervejeiro brasileiro vem crescendo significativamente nos últimos anos, apresentando um crescimento de 10% no faturamento e de 7,5% no consumo entre os anos de 2005 e 2009. Anteriormente, entre os anos de 1990 e 2005 o crescimento foi de 69,7% (REBOUÇAS, 2010). Hoje o Brasil é o quarto no ranking mundial de produção de cerveja, com 10,34 bilhões de Litros por ano, perdendo apenas em volume para a China (35 bilhões de litros por ano), Estados Unidos (23,6 bilhões de litros por ano) e Alemanha (10,7 bilhões de litros por ano) (ELOY, 2010) (Figura 1).

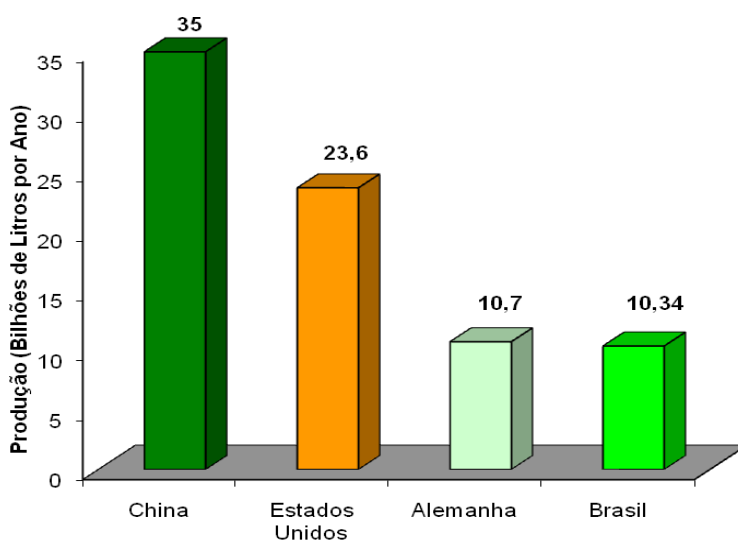


Figura 1. "Ranking" mundial da produção em cerveja em 2010.

Um dos pontos fundamentais para o crescimento do setor foi a criação da multinacional AmBev, em 2000, com a fusão das empresas Antarctica e Brahma. Posteriormente, em 2004, a AmBev e o grupo belga Interbrew anunciaram uma aliança estratégica constituindo a maior cervejaria do mundo (InBev), tornando-se a partir de 2006 a líder mundial do setor com a participação de aproximadamente 13% do mercado e faturamento anual de US\$ 16,7 bilhões (2006), segundo DRAGONE e ALMEIDA E SILVA (2010).

No Brasil a AmBev é a líder absoluta do setor com uma participação de 67,2% e uma produção anual de 19,2 bilhões de litros de cerveja. Na segunda posição do ranking nacional de participação das cervejarias no mercado (Figuras 2) encontra-se a Schincariol, com 12,3% de participação no mercado. O terceiro lugar nacional de cervejas pertence à Petrópolis, com 8,1%, em seguida a Kaiser, 8%.

No mercado mundial de produção de cerveja no ano de 2007 (Figura 3), a InBev (grupo da AmBev) esteve em primeiro lugar com (22,2 bilhões de litros), ficando à frente da sul-africana SAB Miller (21,6 bilhões de litros), da americana Anheuser-Busch (18,32 bilhões de litros) e da holandesa Heineken (13,19 bilhões de litros) (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA, 2010).

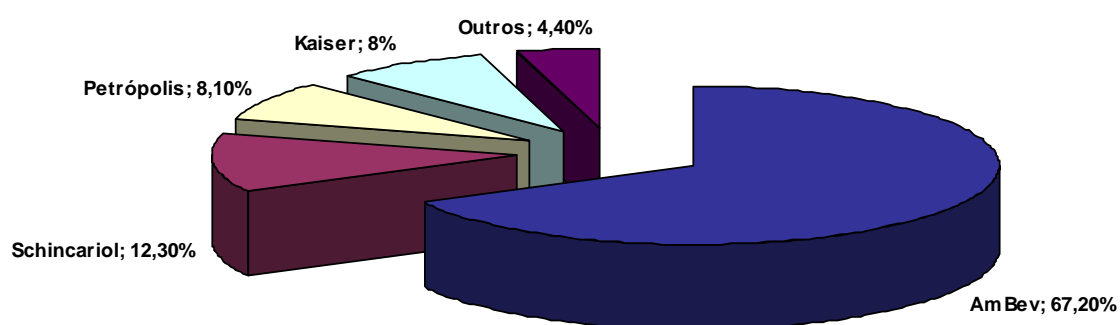


Figura 2. Ranking nacional de participação das cervejas no mercado, ano de 2006.

No Brasil, o consumo *per capita* também aumentou nos últimos anos, passando de 49 L em 2005, para 52 L em 2006. No entanto, o consumo nacional ainda é muito pequeno quando comparado a países como República Tcheca (160 L), Alemanha (116 L) e Irlanda (108 L) (ALMEIDA E SILVA, 2005).

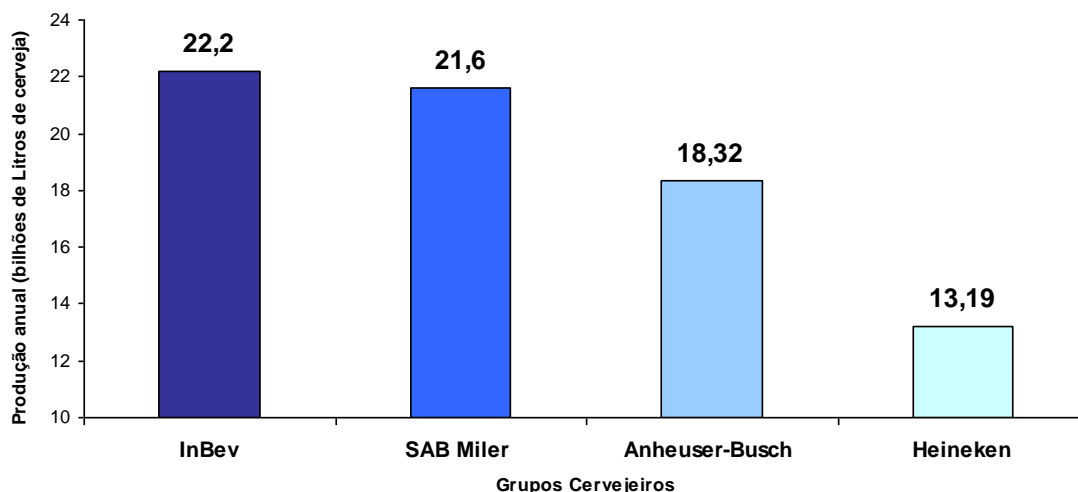


Figura 3. Ranking mundial de produção de cerveja no ano de 2007 por grupo cervejeiro, ano de 2006.

4.3. LEGISLAÇÃO CERVEJEIRA

No Brasil, a produção e comercialização das cervejas são regulamentadas pelo Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009 que regulamenta a pela Lei nº8.918 de 14 de Julho de 1994 (BRASIL, 2010), que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas e autoriza a criação da Comissão Intersetorial de bebidas e dá outras providencias. Segundo o Artigo 36 desta Lei “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”.

Ainda neste mesmo artigo, os parágrafos 4º e 5º determinam que parte do malte de cevada poderá ser substituído por adjuntos cervejeiros, cujo emprego não poderá ser superior a quarenta e cinco por cento em relação ao extrato primitivo. Consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não malteados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal.

4.3.1. Identidade da cerveja

O artigo 37 do Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009 instituído pelo MAPA (BRASIL, 2010) estabelece características de identidade da cerveja, de acordo com os seguintes pontos:

a) A cor da cerveja deverá ser proveniente das substâncias corantes do malte da cevada;

b) Para fermentação do mosto, será usada a levedura cervejeira;

c) A cerveja deverá ser estabilizada biologicamente por processo físico apropriado, podendo ser denominada de Chope ou Chopp a cerveja não submetida a processo de pasteurização para o envase;

d) A água potável empregada na elaboração da cerveja poderá ser tratada com substâncias químicas, por processo físico ou outro que lhe assegure as características desejadas para boa qualidade do produto, em conjunto ou separadamente; e

e) A cerveja deverá apresentar, a vinte graus Celsius, pressão mínima de atmosfera de gás carbônico proveniente da fermentação, sendo permitida a correção por dióxido de carbono ou nitrogênio, industrialmente.

4.3.2. Classificação da Cerveja

O Artigo 38 do Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009 instituído pelo MAPA (BRASIL, 2010) define as classificações das cervejas de acordo com sua composição quanto ao extrato primitivo, quanto à cor, quanto ao teor alcoólico, quanto à proporção de malte e cevada e quanto à fermentação.

4.3.2.1. Quanto ao Extrato Primitivo

Quanto ao extrato primitivo, as cervejas são classificadas em:

a) cerveja leve, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a cinco por cento em peso e menor que dez e meio por cento em peso,

b) cerveja ou cerveja comum, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a dez e meio por cento em peso e menor que doze por cento em peso;

c) cerveja extra, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a doze por cento em peso e menor ou igual a quatorze por cento em peso; ou

d) cerveja forte, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior que quatorze por cento em peso;

4.3.2.2. Quanto à Cor

Quanto à cor, as cervejas são classificadas em:

a) cerveja clara, a que tiver cor correspondente a menos de vinte unidades EBC (European Brewery Convention);

b) cerveja escura, a que tiver cor correspondente a vinte ou mais EBC;

c) cerveja colorida, a que, pela ação de corantes naturais, apresentar coloração diferente das definidas no padrão EBC.

4.3.2.3. Quanto ao Teor Alcoólico

Quanto ao teor alcoólico, as cervejas são classificadas em:

a) cerveja sem álcool, quando seu conteúdo de álcool for menor ou igual a meio por cento em volume, não sendo obrigatória a declaração no rótulo do conteúdo alcoólico; ou

b) cerveja com álcool, quando seu conteúdo em álcool for superior a meio por cento em volume, devendo obrigatoriamente constar no rótulo o percentual de álcool em volume;

4.3.2.4. Quanto a Proporção do Malte de Cevada

Quanto à proporção de malte, as cervejas são classificadas em:

a) *cerveja de puro malte*, aquela que possuir cem por cento de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;

b) *cerveja*, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior ou igual a cinqüenta e cinco por cento em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares; ou

c) "*cerveja de ...*", seguida do nome do vegetal predominante, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior que vinte por cento e menor que cinqüenta e cinco por cento, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;

4.3.2.5. Quanto à Fermentação

Quanto à fermentação, as cervejas são classificadas em:

a) *De baixa fermentação*;

b) *De alta fermentação*.

4.4. MATÉRIAS-PRIMAS

4.4.1. Água

A água é a principal matéria-prima no decorrer de um processo cervejeiro, pois aproximadamente 95 % do peso da cerveja são constituídos de água (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA In: VENTURINI FILHO, 2010). Para elaboração de cervejas a água deve ser potável, com as mesmas características adotadas para o consumo humano, atendendo as exigências físicas, químicas, organolépticas e bacteriológicas. Entre os principais aspectos a água deve se apresentar incolor, isenta de impurezas mecânicas e orgânicas, inodora, sabor neutro e deve apresentar pH entre 6,5 e 8,0.

A quantidade de sais dissolvidos na água também é um parâmetro definidos da qualidade da bebida, influenciando nos processos químicos e enzimáticos que ocorrem durante a fermentação e consequentemente

alterando a qualidade final da bebida. Nos dias atuais graças aos avanços na tecnologia de tratamento de águas, é possível adequar a composição da água para se enquadrar às necessidades do processo de produção da cerveja, como remoção de minerais e purificação e desinfecção.

4.4.2. Malte de Cevada

A cevada (*Hordeum vulgare* sp. *Vulgare*), pertencente à família das gramíneas, é um cereal de inverno que ocupa a quinta posição, em ordem de importância econômica no mundo. Na elaboração de cerveja, a cevada utilizada, é classificada de acordo com as características morfológicas do grão, e quanto ao número de fileiras. Cevada com duas fileiras e cevada com seis fileiras de grãos. A cevada com duas fileiras apresenta grãos maiores, com corpo farinhoso mais extenso rico em amido, casca fina, cor mais clara e menor conteúdo de enzimas. A cevada com seis fileiras de grãos que apresentam morfologia distorcida (retorcida) devido aos grãos laterais.

O malte é resultante do processo artificial e controlado de germinação da cevada cervejeira. Nas indústrias cervejeiras alguns testes são realizados para conferir sua qualidade dos grãos de malte, entre eles: teste do chá, parasitas vivos e morfologia.

O teste do chá quando apresenta resultado atípico é um indicativo de manuseio inadequado de matéria-prima, que possivelmente pode ter entrado em contato com a água, estar com tempo elevado de armazenamento, ou apresentar contaminação. Este teste garante a qualidade sensorial do mosto na primeira etapa de produção.

A presença de parasitas vivos prejudica a qualidade do malte, além de disponibilizam diversos sabores negativos no mosto. A contaminação acontece quando a embalagem do cereal apresenta furos e o armazenamento é inadequado em locais com sujidades.

O aspecto morfológico do malte é um problema de cultivo, genético ou de malteação (processo que acontecem nas maltarias para disponibilizarem o malte para armazenamento destruindo o embrião contido no grão), este tipo de

problema altera a disponibilidade das enzimas contidas no grão, além de minimizarem o corpo farinhoso (amido) do interior do cereal.

4.4.3. Lúpulo

O lúpulo é a inflorescência feminina da planta dióica classificada como *Humulus lupulus*. Juntamente com o malte, o lúpulo é responsável por agregar o sabor e aroma característicos às cervejas.

Natural das zonas temperadas do Hemisfério Norte, o lúpulo é comercializado na forma de flores prensadas, pó, extrato, e principalmente na forma de “pellets”. Feitos a partir das flores não polinizadas que têm maior concentração de substâncias aromáticas (SACHS, 2001). Os países mais importantes no cultivo de lúpulo são: Alemanha, Estados Unidos, República Tcheca, China e Ucrânia.

O sabor característico do lúpulo dentro da cerveja é essencial para o impacto organoléptico total da cerveja, a estabilidade do sabor e a retenção da espuma. Os lúpulos podem ser classificados por diferentes critérios: procedência, aroma ou amargor e variedade (Cluster, Zeus, Taurus, Nugget / Saaz, Hallertau Perle).

4.4.4. Adjunto

Os adjuntos são matérias-primas ricas em carboidratos, utilizadas de forma complementar ao malte, conferindo à cerveja composição e qualidade apropriadas, além de proporcionarem maior rentabilidade no processo de fabricação, seja pelo seu menor valor intrínseco, seja pela maior produtividade do processo.

Na fabricação das cervejas, podem ser adicionados adjuntos que são definidos como matérias-primas ricas em carboidratos que substituem parcialmente o malte, desde que permitidos por lei. São utilizados, principalmente, por razões econômicas, pois apresentam menor custo na produção de extrato em relação ao malte e, além disso, melhoram a qualidade físico-química e sensorial da cerveja acabada (VENTURINI FILHO, 2000).

Os adjuntos não são matérias-primas mundialmente utilizadas na fabricação de cervejas. Certos países, que seguem estritamente a Lei da Pureza, como: Alemanha, Grécia, Noruega e Suíça, produzem sua cerveja utilizando somente cereais malteados.

Os adjuntos são classificados em amiláceos e açucarados, conforme o tipo de carboidrato que predomina em sua composição. Os exemplos mais comuns de adjuntos amiláceos são o arroz, o milho, a cevada, o trigo e o sorgo, enquanto que a maltose (oriunda principalmente do milho) é um exemplo de adjunto açucarado (VENTURINI FILHO, 2000).

4.5. PUPUNHA (*Bactris gasipaes* Kunth)

A pupunheira (*Bactris gasipaes*) é uma palmeira elegante, domesticada pelos Ameríndios da Amazônia, com frutos de sabor agradável e de alto valor nutritivo. O fruto (Figura 4) maduro possui um epicarpo fibroso de cor variável. O mesocarpo é amiláceo a oleoso e úmido, com um endocarpo envolvendo um endosperma fibroso e oleoso (CLEMENT, 1987). O fruto é geralmente consumido após cozimento ou ainda, utilizado para elaborar farinha a qual é utilizada no preparo de várias iguarias. A pupunha é um fruto rico em proteínas, carboidratos, elementos minerais e alto teor de pró-vitamina A (CAVALCANTE, 1991). De acordo com CLEMENT (1997) a composição média de carboidratos nos frutos pode variar de 59,7 a 81,0% em base seca.



Figura 4. Frutos de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunt) em cachos.

4.6. LEVEDURAS CERVEJEIRAS

Dentre os parâmetros que definem a qualidade das cervejas, as leveduras utilizadas no processo fermentativo são de grande importância.

As leveduras são fungos que se apresentam predominantemente sob forma unicelular e se reproduzem vegetativamente por gemulação ou brotamento (CARVALHO *et al.*, 2006). Dentre as leveduras, o gênero *Saccharomyces*, descoberto há 150 anos, é o mais estudado e cujo metabolismo é o mais bem conhecido (AQUARONE *et al.*, 2001).

As células de leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas, não possuem flagelo e, em consequência disso, são imóveis. Possui capacidade de esporulação, importante para manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. São constituídas por água, 68% a 83%, substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas (FICAGNA, 2005).

Durante a fermentação da cerveja, o desempenho das leveduras, ou seja, a habilidade das leveduras em metabolizar eficientemente o substrato (mosto) em etanol e outros produtos é influenciada por vários fatores, como: as características genéticas das leveduras, determinada pela escolha da cepa de levedura a ser utilizada no processo fermentativo; fisiologia celular, relacionada com a viabilidade e a vitalidade das células, bem como, a concentração do inóculo; disponibilidade nutricional, que está relacionada com a concentração e a natureza dos nutrientes presentes no mosto; condições físicas, como temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto (CARVALHO *et al.*, 2006). Sendo assim, as características de sabor e aroma de qualquer cerveja são influenciadas também pelo tipo de leveduras utilizadas na fermentação.

Tradicionalmente, as leveduras mais utilizadas em cervejaria são cepas da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. O gênero *Saccharomyces* apresenta varias cepas consideradas seguras e capazes de produzir dois metabólitos primários importantes: etanol e dióxido de carbono (DIAS *et al.*, 2010.)

4.7. PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO CELULAR EM ALGINATO DE CÁLCIO

O processo de imobilização celular pode ser compreendido como um procedimento que confina fisicamente células íntegras e metabolicamente ativas num sistema reacional que as impedem de passar à fase móvel (DIAS et al., 2010). Uma das principais vantagens da técnica de imobilização refere-se ao aumento da produtividade e eficiência da fermentação devido às elevadas concentrações celulares (COVIZZI et al., 2007) .

No processo de imobilização de biocalizadores há quatro princípios básicos: ligação de superfície, aprisionamento em matriz porosa, contenção por membranas e auto-agregação.

O método de imobilização por meio de ligação a superfícies é carreado por forças eletrostáticas ou por ligações covalentes entre a membrana da célula e o carreador; a imobilização por meio de aprisionamento em matrizes porosas envolve a síntese *in situ* da matriz porosa em torno das células a serem imobilizadas, ou seja, é baseado na inclusão de células dentro de um retículo covalente rígido prevenindo a difusão celular para o meio; o método de imobilização por meio de contenção em membranas envolve a utilização de membranas pré-formadas ou a formação *in situ* da membrana em torno das células a serem imobilizadas e o método de imobilização por meio de auto-agregação consiste em um agregado celular que finda por formar uma unidade maior de célula com propriedade de sedimentar rapidamente (CARVALHO et al., 2006; PANTOJA, 2006).

4.8. PROCESSAMENTO DA CERVEJA

As cervejas são bebidas obtidas pela fermentação alcoólica de mosto cervejeiro, e podem ser classificadas quanto ao tipo de fermentação em *ale* ou *lager*. Cervejas tipo *ale* são obtidas pela a ação de leveduras que emergem para a superfície do meio durante a fermentação tumultuosa (cerveja de alta fermentação), e do tipo *lager* são obtidas pela a ação de leveduras que se depositam no fundo do tanque, durante ou após a fermentação tumultuosa (cerveja de baixa fermentação) (SILVA, 2005). No Brasil a predominância no mercado é de cervejas do tipo *lager*.

O processo de fabricação da cerveja pode ser resumido basicamente em: elaboração do mosto cervejeiro, fermentação do mosto, maturação, filtração, envase e pasteurização da cerveja.

4.8.1. Elaboração do mosto

Para elaboração do mosto cervejeiro o malte passa por um tratamento de remoção física de partículas sólidas como fragmentos metálicos e pedras, entre outros. A remoção dessas partículas é essencial no processo, pois os fragmentos metálicos podem gerar centelha nos rolos de moinho podendo desencadear um processo de explosão, uma vez que o excesso de pó de malte no ambiente torna-se inflamável.

Antes de entrar no processo de mostura o grão do malte é triturado em moinho para exposição do corpo farinhoso (amido) presente em seu interior. Em seguida, é encaminhado para a tina de mostura onde é misturada com adjunto previamente cozido. O adjunto sofre um processo de fervura antes de ser encaminhado a etapa de mostura, para total exposição do amido contido no adjunto.

O processo de mostura tem como objetivo solubilizar inicialmente as substâncias químicas presentes no malte e no adjunto diretamente solúveis em água e, com auxílio de enzimas, solubilizar as substâncias químicas insolúveis, promovendo a gomificação e posterior hidrólise do amido e açúcares (REINOLD, 1997). O controle de temperaturas para ativação dessas enzimas é determinado de acordo com o tipo de cerveja que se deseja obter. No Quadro 1 estão descritas as principais enzimas que atuam no processo de mostura e as condições físicas ideais de pH e temperatura para sua ativação.

Com menos de 30 % de cevada, as enzimas podem ser suficientes para degradação do amido e de proteínas durante o processo de mosturação (STEWART, 1994; HOUGH, 1996). As enzimas são catalisadores biológicos produzidos por seres vivos de natureza protéica dotados de alta especificidade e termo-sensíveis atuando em condições fisiológicas (STREMEL, 2008). Estes catalisadores biológicos são capazes de decompor moléculas complexas em unidades menores.

Quadro 1. Atuação enzimática e condições ótimas de pH e temperatura (TSHOPE, 2001 apud SILVA, 2005).

Enzima	Atuação	pH	Temperatura
Hemicelulase	Decomposição da hemicelulose para glucanos de baixa e média massa molar	4,5 a 4,7	40 a 45 °C
Exo-peptidase	Decomposição das proteínas de alta e média massa molar para aminoácidos	5,2 a 8,2	40 a 50 °C
Endo-peptidase	Decomposição das proteínas para produtos intermediários de alta e média massa molar	5	50 a 60 °C
Dextrinase	Degradação do amido para maltose e maltotriose	5,1	55 a 60 °C
β -amilase	Degradação do amido para maltose	5,4 a 5,6	60 a 65 °C
α -amilase	Degradação do amido para dextrinas	5,6 a 5,8	70 a 75 °C

As enzimas α -amilases estão entre as primeiras enzimas conhecidas. As amilases promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. Essas enzimas são designadas amilolíticas porque promovem a degradação do amido e foram descritas em 1811 nos extratos de trigo, em 1831 na saliva, em 1833 no malte, em 1846 no sangue, e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER, 1982).

O mosto consiste em uma solução complexa e sutilmente equilibrada de carboidratos fermentáveis, aminoácidos e minerais, os quais servem de substrato para o crescimento da levedura e formação de etanol (HORNSEY, 1999). Após o processo de mostura o mosto é filtrado e durante a filtração do mosto cervejeiro o bagaço é separado do mosto. O bagaço é constituído essencialmente pela casca do malte e atua como coadjuvante na filtração no interior das tinas que possuem fundo com ranhuras. É a parte do resíduo que não é solúvel pelas enzimas, apresenta em grande parte de sua constituição proteína e fibras.

O mosto filtrado é encaminhado para a etapa de cozimento, onde é adicionado de lúpulo. Segundo TSHOPE (2001) o processo de cozimento tem os seguintes objetivos concentração do extrato original, eliminação de

compostos voláteis indesejáveis a cerveja, estabilidade microbiológica, extração de compostos amargos do lúpulo, coagulação de proteínas, escurecimento do mosto, entre outros.

Após a fervura o mosto passa por um processo de decantação para retirada do trub, uma mistura de proteínas coaguladas e gordura. Após a retirada do trub o mosto é resfriado e enviado a um tanque para ser armazenado durante a fermentação, onde é inoculado com leveduras.

4.8.2. Fermentação

A fermentação do mosto cervejeiro pode ser influenciada por vários fatores. Entre estes, destacam-se a composição do mosto, a temperatura da fermentação, o nível de oxigênio inicial, a viabilidade celular e a concentração de etanol.

A fermentação da cerveja está dividida em quatro partes: início de fermentação, kräusen baixo, kräusen alto e final de fermentação. Estas etapas foram reportadas por SENAI (1997).

No início da fermentação as leveduras passam por um processo de adaptação ao meio. Nas primeiras 12 a 18 horas, acontece a multiplicação celular, formação de espuma e CO₂. Após 24 horas de fermentação, devido as reações exotérmicas ocorridas durante o metabolismo celular ocorre uma pequena elevação da temperatura da cerveja em fermentação, consumo do extrato e decréscimo do pH.

Durante a fase do kräusen baixo o processo de fermentação intensificada juntamente com as taxas de multiplicação celular, havendo baixa produção de espuma e maior formação de CO₂. Esta fase dura cerca de 2 dias, durante este tempo ocorre a precipitação das resinas de lúpulo e componentes do trub, remanescentes do processamento do mosto.

A fase do kräusen alto tem início entre o 3º e 4º dia de fermentação, dependendo da temperatura. Esta etapa é caracterizada pela fermentação mais intensa, com maior decréscimo do pH e formação do CO₂.

No final da fermentação a camada de espuma começa a diminuir, formando uma película espessa. A atenuação do extrato do pH são mais lentas.

Durante essas fases o metabolismo da levedura se divide em fermentação aeróbica, inicialmente, até total consumo do O₂ dissolvido no mosto seguida de fermentação anaeróbica, resultando na formação de etanol CO₂ e energia.

4.8.2.1. Fermentação Aeróbica

A levedura é inoculada no mosto e durante o processo de enchimento do tanque fermentador, o mosto é aerado para ativação do metabolismo aeróbico desses microrganismos. Na presença de oxigênio no meio, a rota respiratória da levedura predomina em relação a rota fermentativa, uma vez que o processo de obtenção de energia via respiração é mais eficiente à levedura. O oxigênio é consumido pelas leveduras em poucas horas e utilizados para produzir ácidos carboxílicos e esteróis essenciais para produção de membrana celular (MUNROE, In: HARDWICK, 1994a).

Durante a via respiratória há intensa multiplicação celular, formação de membranas celulares, pouca formação de espuma no meio e reduzida queda de extrato do mosto. O oxigênio é essencial durante a fase inicial de fermentação, que consiste na adaptação da levedura ao meio e obtenção balanceada de componentes sensoriais de saboroma. Porém elevada aeração do mosto pode causar altas taxas de multiplicação celular gerando espumamento do mosto no interior do tanque de fermentação, com risco de transbordo e formação de compostos indesejáveis ao saboroma da cerveja como acetaldeídos, ésteres, alcoóis superiores e dicetonas (SENAI, 1997).

4.8.2.2. Fermentação Anaeróbica

À medida que o oxigênio é consumido na respiração a levedura busca outra rota alternativa para obter energia, através da rota fermentativa. Este rota

consiste na fase anaeróbica caracterizada pela intensa queda de extrato, liberação de calor para o meio e formação de espuma.

Durante a fase fermentativa os açúcares presentes no mosto são consumidos pelas leveduras e convertidos em etanol, gás carbônico e calor (VARNAM e SUTHERLAND, 1997). No final do processo fermentativo a cerveja ainda não apresenta os sabores e aromas (saboromas) desejáveis (MUNROE, In: HARDWICK, 1994b).

4.8.3. Maturação

Ao iniciar-se a maturação, a maior parte dos açúcares foi metabolizada em etanol, gás carbônico, glicerol, ácidos orgânicos e alcoóis superiores. Durante o processo de maturação ocorrem algumas alterações importantes para a cerveja, como: o gás carbônico produzido durante a fermentação provoca a carbonatação da cerveja, o repouso a baixas temperaturas provoca precipitação de material protéico em suspensão resultante de leveduras que permaneceram em suspensão e maturação do saboroma da cerveja devido à transformações que ocorrem na concentração de alguns compostos químicos (CARVALHO et al., 2007).

4.8.4. Filtração

A cerveja depois de maturada deve ser filtrada, com isso as partículas retidas pela filtração ficam depositadas dentro do meio filtrante obstruindo os poros do filtro. Com o tempo essas partículas se acumulam e diminuem a efetiva de filtração. Existem três parâmetros de controle de filtração: pressão diferencial ou perda de pressão, vazão e área efetiva ou quantidade de poros livres estão intimamente relacionados; e a mudança de um deles resulta na alteração de pelo menos um dos outros (SENAI, 1997).

A filtração é um processo bem definido. A medida que os componentes particulados da cerveja são filtrados a pré-camada diminui a vazão de filtração, aumentando a pressão do filtro e dificultando o processo de filtração; remove partículas por barreira física da terra infusória ou por adsorção (forças

moleculares ou eletrocinéticas). Após ser filtrada a cerveja é encaminhada para o envase que pode ser realizado em barril para chopp, garrafa de vidro ou lata.

4.8.5. Envase da Cerveja

A cerveja antes do processo de pasteurização é considerada chopp. Portanto, no momento do envase pode ser direcionada a um barril de chopp e encaminhada ao mercado. Quando a cerveja é envasada em garrafa de vidro ou latas de alumínio sofre o processo de pasteurização e é transformada em cerveja.

A pasteurização é um processo térmico, no qual a cerveja é submetida a um aquecimento de 60 °C e posterior resfriamento, visando conferir maior estabilidade microbiológica ao produto. Graças a este processo, é possível às cervejarias assegurar uma data de validade ao produto de seis meses após fabricação, diferente do chopp que possui validade de 7 dias. O processo de pasteurização é muito difundido em toda a indústria de alimentos e bebidas, e em nada altera a composição do produto.

4.9. FUNDAMENTOS ANALÍTICOS

4.9.1. Contaminantes na Cerveja

Dentre os microrganismos contaminantes presentes nas cervejas, podemos destacar as bactérias e as leveduras selvagens.

As Bactérias são agentes danificadores comuns da cerveja. São comumente divididas entre bactérias gram-positivas e gram-negativas. As bactérias gram-positivas, representadas pelos *Lactobacillus* e *Pediococcus* são as que trazem maiores problemas para a cerveja, produzindo ácido láctico e acético, dióxido de carbono, etanol e glicerol. Entre as bactérias gram-negativas, que causam danos à cerveja, podemos destacar as bactérias acéticas e enterobactérias (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA, 2010).

Levedura selvagem é qualquer levedura diferente da levedura de cultivo utilizado na elaboração de cerveja. Podem aparecer por sobreviverem nas mesmas condições das leveduras cervejeiras. Os efeitos potencialmente

causados pela contaminação por leveduras selvagens estão relacionados com o tipo de contaminante. Se o contaminante é uma espécie cervejeira pode acelerar o processo de fermentação e alterar a atenuação final, floculação e paladar do produto final. No entanto se for uma levedura não cervejeira podem ocorrer formação de compostos químicos que geram sabor e aroma negativo na cerveja, como fazem as bactérias (DRAGONE e ALMEIDA E SILVA, 2010).

4.9.2. Composição Físico-química

A caracterização da composição físico-química das bebidas alcoólicas, incluindo as cervejas, é uma ferramenta importante para a qualificação da qualidade das bebidas, fornecendo informações também para a sua classificação e comercialização. Dentre os parâmetros avaliados na composição físico-química podemos citar: extrato original; extrato aparente, coloração, amargor, gás carbônico e pH, entre outros.

O extrato original refere-se a concentração de açúcares e alguns oligossacarídeos disponíveis no meio no início da fermentação da cerveja, o extrato aparente refere-se aos nutrientes que permaneceram na cerveja após a fermentação. Entre os açúcares existem alguns polissacarídeos que não são fermentáveis, conhecidos como dextrinas, elas possuem no mínimo cinco monômeros na sua estrutura química (CARVALHO et al., 2007). O controle da concentração de dextrinas é realizado na mosturação, quanto maior o tempo em contato com as enzimas amilolíticas, menor a concentração destes açúcares no meio.

A coloração da cerveja é oriunda do tipo de matéria-prima utilizada em sua fabricação, o malte é o principal contribuinte, quando necessário pode ser utilizado caramelo para essa finalidade. Outro processo que escurece o mosto é o elevado tempo de fervura, que provoca o processo de cristalização dos açúcares e quando combinados com aminoácidos escurecem o mosto, porém este procedimento não é interessante no processo cervejeiro.

A principal fonte de amargor para a cerveja é o lúpulo. Para uma mesma concentração de iso- α -ácidos o amargor pode ser diferente para cada bebida, dependendo da concentração dos isômeros *cis* e *trans*. Estes

contribuem com proporções diferente para o amargor da cerveja e sua formação depende das condições de isomerozação dos iso- α -ácidos, ocorrida durante a fermentação do mosto (TECHAKRIENGKRAIL, 2004)

Os ácidos orgânicos, que são essencialmente subprodutos excretados pelas leveduras, são os responsáveis pela acidez da cerveja. Sensorialmente, a função mais importante dos ácidos orgânicos na cerveja é aumentar a acidez do produto para um nível agradável ao paladar humano (HARDWICK, 1994).

Os ácidos orgânicos são importantes não somente por contribuir para o sabor e o aroma da cerveja, mas também por influenciar seu pH, de forma que um decréscimo durante a fermentação afeta as propriedades de cerveja, como a estabilidade à turbidez não biológica, a estabilidade do sabor, a suscetibilidade e as alterações microbiológicas e a percepção do amargor, que aumenta com a elevação do pH (BUSHELL, 1994).

Durante a fermentação e maturação da cerveja formam-se redes coloidais que podem precipitar e ocasionar a turvação da cerveja engarrafada, durante o armazenamento a frio. Esses precipitados coloidais consistem em agregados de proteínas e polifenóis, extraídos do malte e lúpulo. A maioria desses precipitados se forma na maturação (SIEBERT, 1999).

As dicetonas (Figura 5) apresentam um limite de detecção sensorial quando estão presentes na cerveja em níveis superiores a 0,05 mg/L totais (LINKO et al., 1998). Esses compostos conferem a cerveja um sabor amanteigado, um saboroma negativo. O diacetil ou dicetonas vicinais (2,3 – butanodiona e 2,3 – pentanodiona) é o composto que apresenta maior impacto no saboroma da cerveja. O controle eficiente da produção de diacetil pode ser obtidos de duas maneiras: prevenção da formação do precursor α -acetolactato e pelo aumento da taxa de descarboxilação química do precursor (CARVALHO et al, 2007).

c) Acetaldeído

O acetaldeído é normalmente produzido durante a fermentação e em seguida reduzido em álcool pela levedura. Entre os principais fatores que ocorrem no processo que levam a formação desses compostos estão: produção excessiva pela levedura e reassimilação insuficiente ao final da fermentação, oxidação de álcool resultante da incorporação de oxigênio após fermentação. Quanto maior for a concentração de Acetaldeídos, maior será a característica de oxidação da cerveja.

Fatores que inibem a multiplicação celular, tais como a falta de zinco e de O_2 , inibição do metabolismo por CO_2 , deficiência de lipídeos e de aminoácidos, estão normalmente associados a uma formação mais acentuada de acetaldeído pela levedura.

d) Ésteres

Os ésteres são compostos importantes na composição do aroma da cerveja, formados na fermentação pela levedura. Alguns possuem papel importante no saboroma da cerveja, como o acetato de isoamila (saboroma banana, frutal) e o hexanoato de etila (saboroma de maçã verde), outros são prejudiciais como o acetato de etila (saboroma negativo de solvente). Entre os principais fatores que ocorrem no processo que levam a formação de ésteres destacam-se a o aumento da temperatura e da concentração de açúcares no mosto, que aumenta a produção de álcoois superiores e a produção de ésters.

e) Compostos de Enxofre

Os compostos sulfurosos são eliminados da cerveja através da produção de CO_2 que os retira da cerveja e também em maturações prolongadas. O sulfeto de hidrogênio (H_2S) e o dióxido de enxofre (SO_2) são provenientes da atividade metabólica da levedura. São subprodutos da síntese de aminoácidos que contêm enxofre (Cisteína e Metionina) originários do sulfato. Em excesso transmitem saboroma extremamente negativo à cerveja.

f) DMS

Normalmente são originados na matéria prima, portanto não são produzidos na fermentação. Conferem à cervja sabor de palha, feno ou vegetais cozidos. Entre as principais ocorrências que provocam sua formação destacam-se: pH elevado na água de lavagem de bagaço (pH >6,0), utilização de malte com alto teor de pó e palha e baixa intensidade de fervura (baixas taxas de evaporação).

g) Metálico

Seu saboroma negativo está relacionado com ferro, tinta ou sangue. Indicativo de alta concentração de íons ferro na água cervejeira, provenientes de tubulações e equipamentos, deficiência na camada do verniz nas superfícies de rolhas e latas ou podem ser provenientes da oxidação de lipídios. Altas concentrações afetam o paladar e podem proporcionar o desenvolvimento de reações de oxidação, contribuindo para perda de estabilidade de produto, envelhecimento precoce.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. MATERIAL

Os materiais básicos utilizadas para elaboração da cerveja foram: água, malte de cevada, lúpulo e leveduras (Figura 6). Como fonte secundária de amido, parte do malte foi substituída por farinha de pupunha.

a) Água

Para elaboração da cerveja foi utilizada água potável, ou seja, inodora, incolor e sem sabor, obtida de poço artesianos distribuída no Campus I da Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP).

b) Malte de Cevada

O malte utilizado foi malte claro, do tipo Pilsen, de origem comercial doado pela Maltaria do Vale S/A. O malte foi armazenado em local livre de umidade até momento do uso. O mesmo não apresentou presença de parasitas vivos, o que inviabilizaria sua utilização.

c) Lúpulo

Foi utilizado o lúpulo de amargor em pellets da variedade SAAZ.

d) Leveduras

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* específica para cerveja, foi doada pela Cervejaria do Gordo, localizada na cidade de Lorena/SP.

e) Pupunha

Os cachos de frutos foram adquiridos na Feira da Banana na cidade de Manaus/AM, com recursos financeiros concedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM.

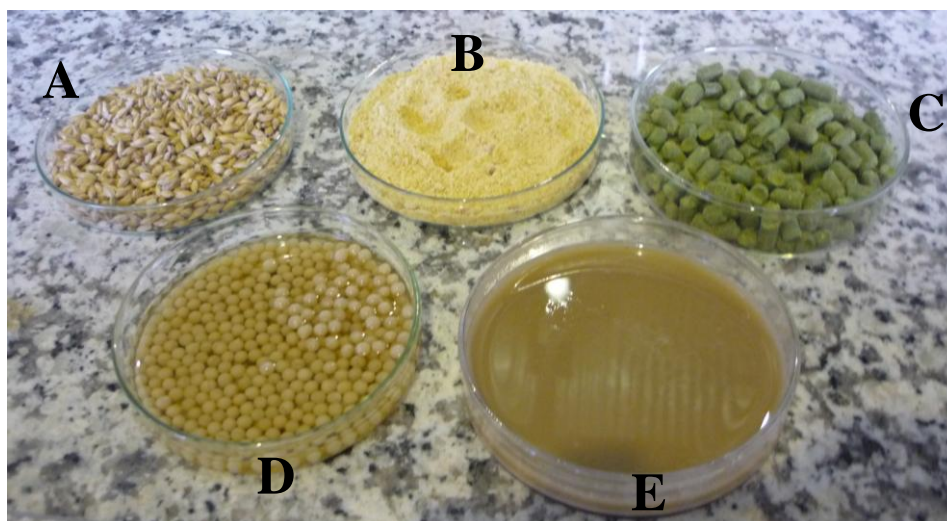


Figura 6. Ingredientes utilizados para elaboração da cerveja: malte (A), farinha de pupunha (B), lúpulo (C), leveduras imobilizadas em alginato de cálcio (D) e leveduras livres (E).

5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento consistiu na elaboração de duas cervejas tipo lager utilizando como adjunto a farinha de pupunha (45 % total de extrato original da cerveja). As bebidas foram elaboradas por processos fermentativos conduzidos de duas formas, um empregando o agente fermentativo na forma livre e o outro na forma imobilizada em alginato de cálcio. As etapas resumidas do experimento podem ser visualizadas na Figura 7.

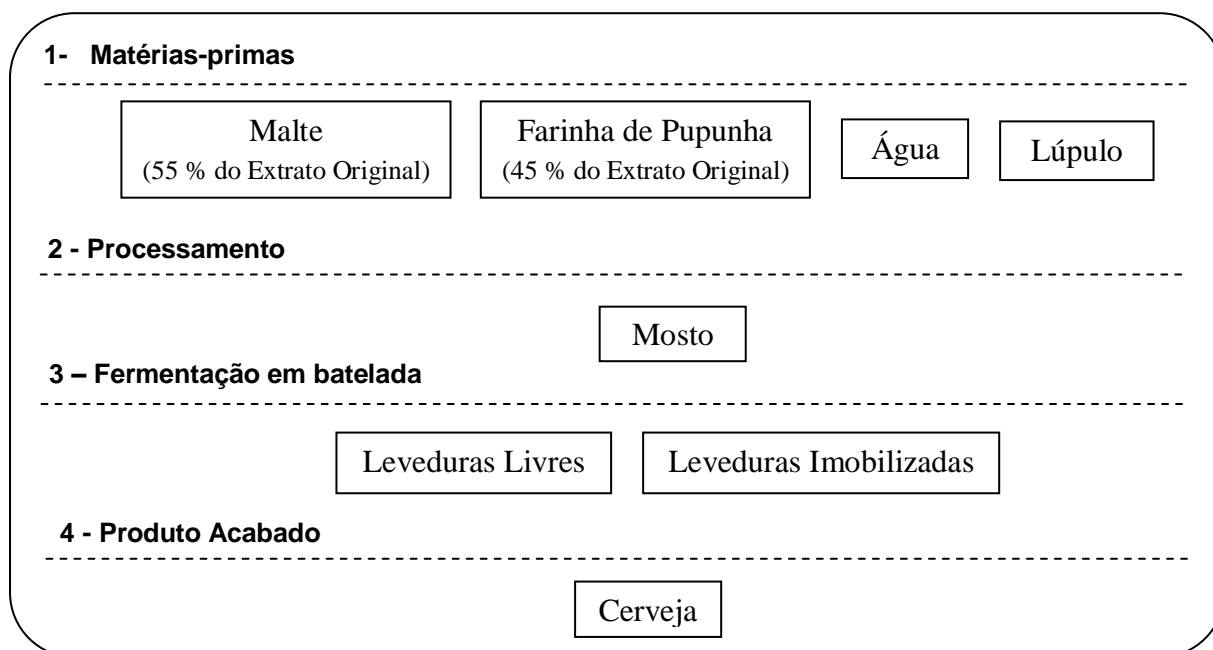


Figura 7. Delineamento experimental com as etapas resumidas do processo de produção da cerveja elaborada com farinha de pupunha e fermentada empregando leveduras livres e imobilizadas.

5.3. AQUISIÇÃO E BENEFICIAMENTO DO FRUTO

Os cachos de pupunha de diferentes variedades (Figura 8) foram adquiridos na Feira da Banana, localizada na cidade de Manaus/AM. Os frutos foram debulhados e selecionados quanto à sanidade, grau de maturação e injúrias, e lavados em água corrente. Foram adquiridos 100 cachos de pupunha, para realização do trabalho.



Figura 8. Diferentes variedades de frutos de pupunha em cachos.

5.4. OBTENÇÃO DA FARINHA DE PUPUNHA

Os frutos sem o ápice e a base foram branqueados por 30 minutos, a contar do início da fervura (95 ± 1 °C), e em seguida descascados manualmente e despulpados. A polpa foi distribuída em bandejas de aço inox e submetidas a secagem em estufa com circulação de ar forçada a 65 °C por 48 horas. A polpa desidratada foi triturada em liquidificador e em seguida peneirada, em peneira de aço inoxidável com malha de 0,8 mm, para obtenção da farinha que foi acondicionada em sacos plásticos de alta densidade com capacidade para 20 Kg e armazenada em freezer a -18 ± 1 °C até o momento do uso. O processamento do fruto até a obtenção da farinha de pupunha está sequenciado no fluxograma a seguir (Figura 9).

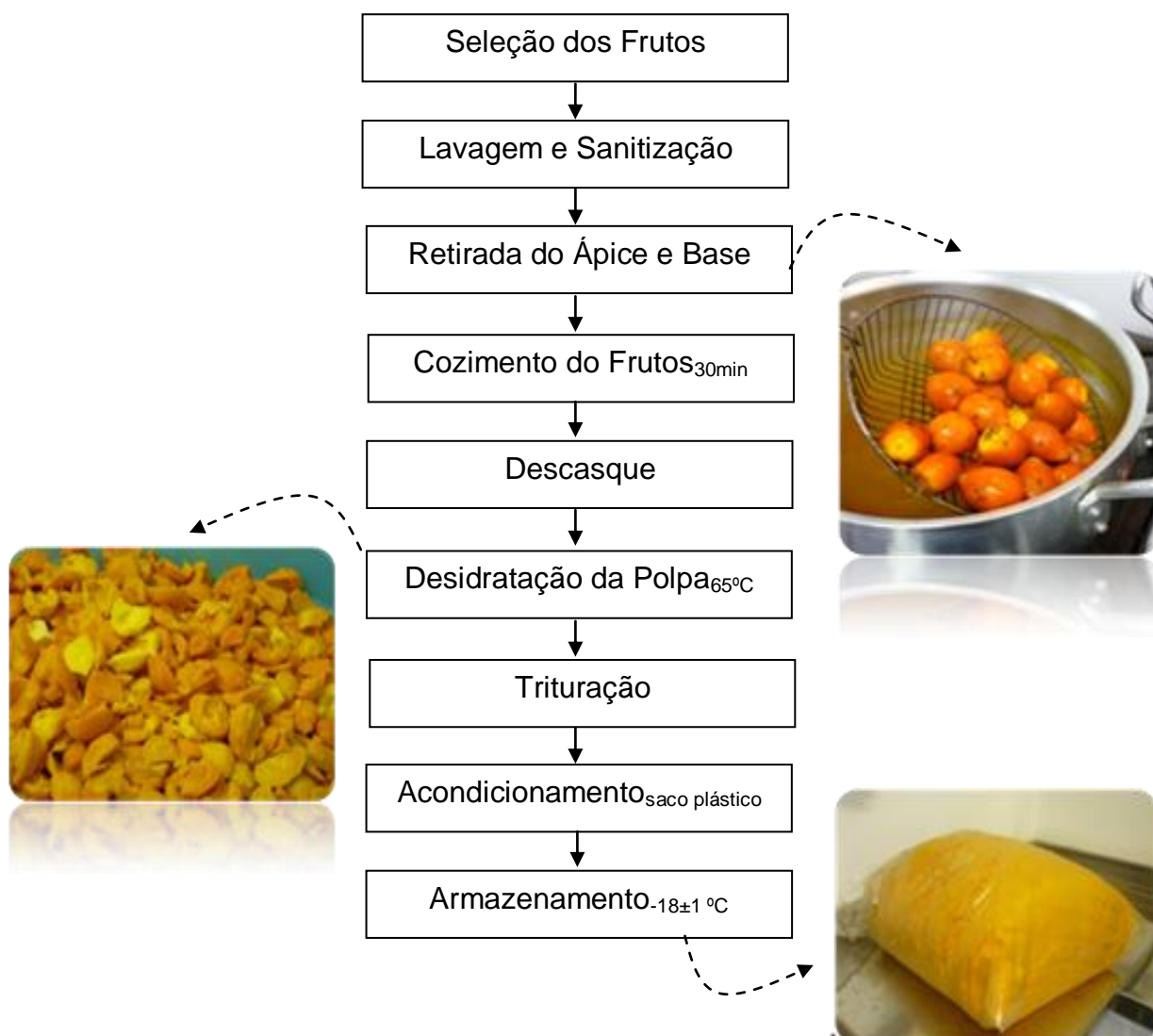


Figura 9. Fluxograma de obtenção da farinha de pupunha.

5.5. CARACTERIZAÇÃO DA FARINHA DE PUPUNHA

5.5.1. Rendimentos do Fruto

Os rendimentos em polpa (massa de polpa/massa de fruto), em farinha (massa de farinha/massa de polpa) e rendimento total em farinha (massa do fruto inteiro/massa de farinha) foram avaliados a partir de 20 frutos selecionados de forma aleatória. A Figura 10 mostra a polpa e a farinha de pupunha. Os cálculos para a obtenção dos rendimentos estão apresentados a seguir.



Figura 10. Polpa (A) e a farinha (B) de pupunha.

a) Rendimento em polpa

$$RP (\%) = \frac{M_p}{M_f} \cdot 100$$

Onde:

- $RP (\%)$ = rendimento em polpa
- $M_p (g)$ = massa da polpa
- $M_f (g)$ = massa do fruto

b) Rendimento em farinha

$$RF (\%) = \frac{M_{fp}}{M_p} \cdot 100$$

Onde:

- $RF (\%)$ = rendimento em farinha
- $M_{fp} (g)$ = massa da farinha de pupunha
- $M_p (g)$ = massa da polpa

c) Rendimento total do fruto em farinha

$$RT (\%) = \frac{M_{fp}}{M_f} \cdot 100$$

Onde:

- $RF (\%)$ = rendimento em farinha
- $M_{fp} (g)$ = massa da farinha de pupunha
- $M_p (g)$ = massa da polpa

5.5.2. Caracterização Físico-química

a) Umidade

A análise de umidade foi realizada por gravimetria de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolpho Lutz – IAL (2008). A análise foi realizada pesando-se um grama de farinha de pupunha em cápsulas de alumínio previamente secas e pesadas. Em seguida as cápsulas contendo amostra foram colocadas em estufa com circulação de ar forçada, a 105°C até peso constante. Os resultados obtidos foram expressos em g.100g⁻¹ de matéria integral.

$$MS (g.100g^{-1}) = \frac{P_{mf} - P_{ms}}{P_{mf}} \cdot 100$$

$$Umidade (g.100g^{-1}) = 100 \% - MS$$

Onde:

- $MS (g.100g^{-1}) =$ Matéria seca
- $P_{mf} (g) =$ Peso da farinha de pupunha fresca
- $P_{ms} (g) =$ Peso da farinha de pupunha desidratada

b) Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria de acordo com IAL (2008). Dois gramas de amostra foram pesados, em cadinho previamente calcinado e com peso conhecido. A amostra foi incinerada em mufla a 550 °C, deixando-o por após resfriamento em dessecador, novamente submetida a pesagem. Os resultados foram expressos em g.100g⁻¹ de cinza.

$$Cinza (g.100g^{-1}) = \frac{P}{A} \cdot 100$$

Onde:

- $P (g) =$ cinza, ou amostra final
- $A (g) =$ amostra inicial

c) Lipídios

Foi determinado por gravimetria de acordo com os métodos do IAL (2008). Três gramas de amostra de farinha de pupunha foram transferidas para um cartucho de papel filtro Qualy com porosidade de 14 µm, previamente

pesado. Em seguida o cartucho foi posicionado no aparelho extrator Soxhlet para extração dos lipídios com éter de petróleo. O processo é realizado em aproximadamente 24 horas, sob sucessivas lavagens da amostra para arraste de lipídeos. Por fim a amostra drenada para um balão de fundo chato previamente seco e de peso conhecido foi levada ao banho Maria para evaporação do éter e em seguida colocada em estufa a 105 °C até peso constante. O balão de fundo chato contendo o lipídio foi resfriado em dessecador e novamente pesado. O resultado foi expresso em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de lipídios e calculado de acordo com formula a seguir.

$$\text{Lipídios (g}\cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{P}{A} \cdot 100$$

Onde:

- P (g) = lipídio, ou amostra final
- A (g) = amostra inicial

d) Fibra Total

O teor de fibra total foi determinado por gravimetria conforme descrição do IAL (2008). Uma amostra de 0,5 g de farinha de pupunha seca e desengordurada foi tratada com ácido e base e, em seguida, filtrada em cadinho de Gooch com auxílio de bomba a vácuo. A amostra passou por sucessivas lavagens com água destilada a temperatura de $80\pm 1^\circ\text{C}$ até a neutralidade da amostra. Após esta etapa a amostra seguiu para a estufa com circulação de ar forçada à temperatura de 105 °C, até peso constante. O resultado foi expresso em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de fibra e calculado de acordo com formula a seguir.

$$\text{Fibras Totais (g}\cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{P}{A} \cdot 100$$

Onde:

- P (g) = fibra, ou amostra final
- A (g) = amostra inicial

e) Proteínas

O teor de proteínas foi determinado a partir da matéria seca, pelo método Micro-Kjeldahl, segundo metodologia do IAL (2008). Foram pesados

0,5 g da amostra em papel vegetal, que foi depositado em um tubo de ensaio próprio para elevadas temperaturas. Neste adicionou-se 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, 300 mg de sulfato de potássio e 300 mg de sulfato de cobre. Os tubos foram posicionados em um bloco digestor até total digestão, observada pela coloração esverdeada translúcida da amostra. Neste processo a temperatura inicial foi de 50 °C sendo elevada até 350 °C. Em seguida, foi realizada a destilação em aparelho Kjeldahl com o uso de 15 mL de NaOH 50%.

O material destilado foi coletado (cerca de 75 mL) em um erlenmeyer contendo 15 mL de ácido bórico e 3 gotas da solução indicadora (indicador de solução alcoólica composto por vermelho de metila e verde de bromocresol 1:5) e em seguida submetido a titulação com HCl 0,02 mol/L. Os resultados foram expressos em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de proteína total e calculado conforme segue.

$$\text{Proteína (g}\cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot M_{\text{HCl}} \cdot 14 \cdot F \cdot 100}{P}$$

Onde:

- V_{HCl} (mL) = volume gasto de HCl
- M_{HCl} (molaridade) = molaridade do ácido clorídrico
- F = fator de correção do ácido
- P (g) = peso da amostra

f) Carboidratos

A leitura dos carboidratos foi realizada de acordo com IAL (2008). O resultado foi calculado por diferença a partir da soma dos resultados de cinzas, fibras, lipídios, proteínas e umidade, subtraídos de 100. O resultado foi expresso em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$.

g) Valor Energético

A metodologia seguida para determinação do valor energético foi descrita por DE ANGELIS (1977). O valor calórico foi calculado utilizando-se os seguintes fatores de conversão de Atwater: 9 Kcal por um g de lipídios, 4 Kcal

por g de proteínas e 4 Kcal por g de carboidratos. Os resultados foram expressos em kcal.100g⁻¹ de matéria integral.

h) Potencial Hidrogeniônico (pH)

As análises foram realizadas por leitura direta em pHmêtro conforme a metodologia descrita pelo IAL (2008). Foram pesados 10 g de amostra sólida da farinha de pupunha que foi diluída em 10 mL de água destilada. O resultado foi expresso em número inteiro seguido da sigla pH.

i) Sólidos Solúveis Totais (SST)

A análise foi realizada por refratometria conforme a metodologia descrita pelo IAL (2008). Foi retirada uma amostra da solução utilizada para leitura do pH, conforme item anterior, e uma gota filtrada em algodão foi colocada sobre o prisma de um refratômetro e a leitura realizada de acordo com a escala padrão do aparelho. O resultado foi expresso em °Brix.

j) Acidez Total

As análises foram realizadas por titulometria conforme metodologia do IAL (2008). Um grama de amostra foi transferido para um erlemmeyer de 125 mL, o qual foi adicionado de 50 mL de água destilada e 3 gotas de fenolftaleína 1%. Após homogeneização a amostra foi titulada com NaOH 0,1 M. Ao atingir o ponto de “virada”, o volume gasto de solução foi registrado para cada amostra. Os resultados foram expressos em g.100g⁻¹ e o cálculo foi realizado conforme a equação apresentada a seguir.

$$\text{Acidez (g.100g}^{-1}\text{)} = \frac{F \cdot Vg \cdot 100}{P \cdot C}$$

Onde:

- *F* = Fator de correção do NaOH
- *Vg* = Volume de NaOH gasto na titulação
- *P* = Peso da amostra
- *C* = Correção para solução de NaOH, caso a concentração tenha sido NaOH 0,1 M usar valor 10.

k) Açúcares: Redutores (AR), Redutores Totais (ART) e Não Redutores (ANR)

As análises foram realizadas conforme metodologia de Somogyi-Nelson descrita por SOUTHGATE (1991). Para extração da amostra foi pesado 1 g de amostra, a qual foi diluída em água destilada, tendo o volume completado para 100 mL em balão volumétrico. Após homogeneização procedeu-se a quantificação dos açúcares redutores (AR) por espectrofotometria. Para quantificação dos ART, uma alíquota de 1,5 mL a partir da amostra extraída foi submetida à hidrólise ácida com 75 uL de HCl, por 1 hora. Em seguida a amostra foi neutralizada com NaOH 1 M, completando-se o volume para 50 mL e após homogeneização procedeu-se a quantificação por espectrofotometria. Os ANR foram quantificados pela diferença entre o teor de ART e AR.

A quantificação dos açúcares foi realizada como descrito a seguir. Em microtubo tipo Eppendorf foi adicionado 100 uL da amostra e 100 uL da solução AB (Quadro 2), após homogeneização foi incubado em banho de água fervente por 15 minutos, seguido de resfriamento em banho de água com gelo. A seguir foi adicionada a solução C (Quadro 1), 1,5 mL de água seguida de homogeneização e leitura espectrofotométrica a 540 nm. Um branco foi preparado substituindo-se o volume de amostra por água, seguindo as mesmas condições descritas para quantificação. Foi feita uma curva padrão (Gráfico 1) com solução de glicose 1 g.L⁻¹, nas concentrações de 0,05 a 0,5 g.L⁻¹. Os resultados foram expressos em g.100g⁻¹ de amostra

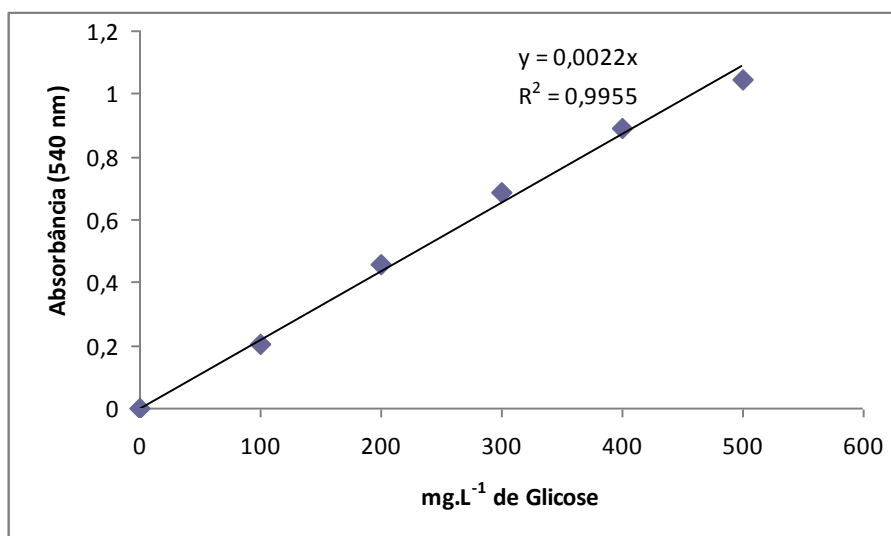


Gráfico 1. Curva padrão de glicose 1 g.L⁻¹ para quantificação de açúcares.

Quadro 2. Composição das soluções empregadas no método de Somogy-Nelson para determinação dos teores de açúcares.

Soluções	Composição e Preparo
Solução A	5g de NaHCO ₃ ; 3,75g de Tartarato de sódio e potássio (sal de Rochelle); 45g de Na ₂ SO ₄ ; 7,5g de Na ₂ CO ₃ . Em volume de 250 mL de H ₂ O destilada.
Solução B	18g de Na ₂ SO ₄ anidro; 50 mL de solução Cu SO ₄ . 5 H ₂ O a 4% p/v Completar para 100 mL de água destilada
Solução C	25 g de (NH ₄)Mo ₇ O ₂₄ . 7 H ₂ O em 450 mL de água destilada; 21 mL de H ₂ SO ₄ ; 3 g de NaHSO ₄ . 7 H ₂ O em 25 mL de água.

I) Amido

O teor de amido foi determinado por espectrofotometria segundo a metodologia de McCREADY (1950). Para a determinação dos teores de amido foi pesado 0,2g de amostra seca, cominuída diretamente em tubos de centrífuga, seguida da adição de 10 mL de etanol 80% fervente para solubilização de mono, di, tri e oligossacarídeos. As amostras foram submetidas a centrifugação a 3000 rpm por 10 min, sendo o sobrenadante reservado para análise de açúcares solúveis e o precipitado reservado para a quantificação do teor de amido. O precipitado foi ressuspenso em 11,5 mL de ácido perclórico a 30%, seguido de agitação por dois minutos em agitador tipo *vortex* e repouso por 30 minutos, com agitações ocasionais. Logo após procedeu-se novamente a centrifugação a 3.000 rpm por dez minutos, sendo o sobrenadante coletado em balão volumétrico de 100 mL para posterior ajuste do volume com água destilada.

A determinação dos teores de amido foi realizada pela reação com antrona, onde, alíquotas de 0,1 a 1,0 mL dos extratos contidos em tubos de ensaio, tiveram o volume completado para 1 mL com água destilada, seguido da adição de 5,0 mL do reagente de antrona e homogeneização por dois minutos em aparelho tipo *vortex*. Os tubos foram incubados por 12 minutos em banho de água em ebulição e a transferidos para o banho de água em ebulição por 12 minutos, seguidos de resfriamento em banho de água com gelo até a

temperatura ambiente. As amostras foram lidas a absorbância de 620 nm. A curva padrão (Gráfico 2) para determinação espectrofotométrica dos teores de amido foi preparada com D-glicose, nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80, e 100 mg em 1,0 mL de água destilada, sendo o resultado multiplicado pelo fator 0,9. Os resultados foram expressos em $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de farinha.

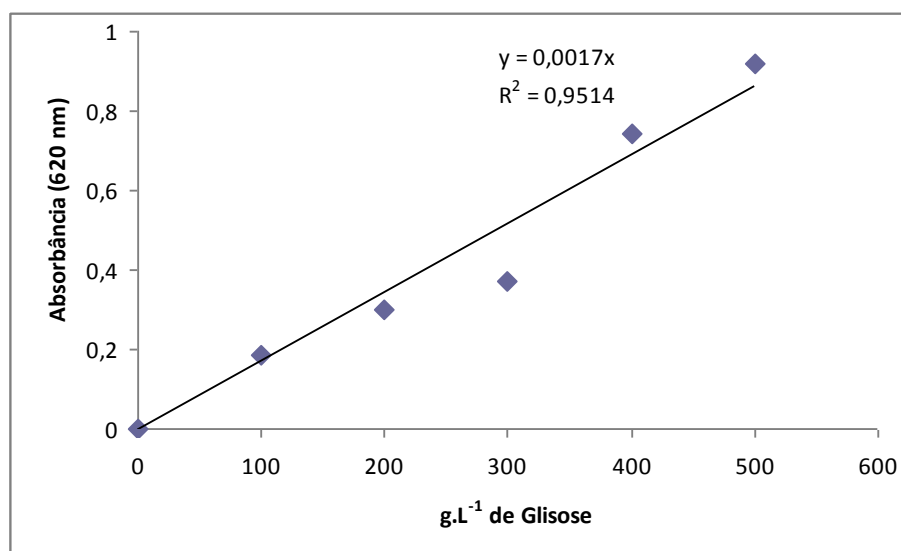


Gráfico 2. Curva padrão de glicose $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ para quantificação do teor de amido.

m) Compostos Fenólicos:

A análise de compostos fenólicos foi realizada por espectrofotometria de acordo com a metodologia da SINGLETON e ROSSI (1965). A extração dos compostos fenólicos foi feita com metanol a 80 % a partir de 5 g de farinha de pupunha e a quantificação pela mistura de 400 μL de amostra, 400 μL de solução de *Folin cateou* e 3,2 mL de água destilada. Após repouso de 5 minutos foi adicionado 4 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e em seguida avolumado para 10 mL em balão volumétrico. Após repouso de 90 minutos a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 750 nm. Foi preparada uma curva padrão com ácido gálico (GAE), nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Gráfico 3). Os resultados foram expressos $\text{mg}_{\text{GAE}}\cdot 100\text{g}^{-1}$ de amostra fresca.

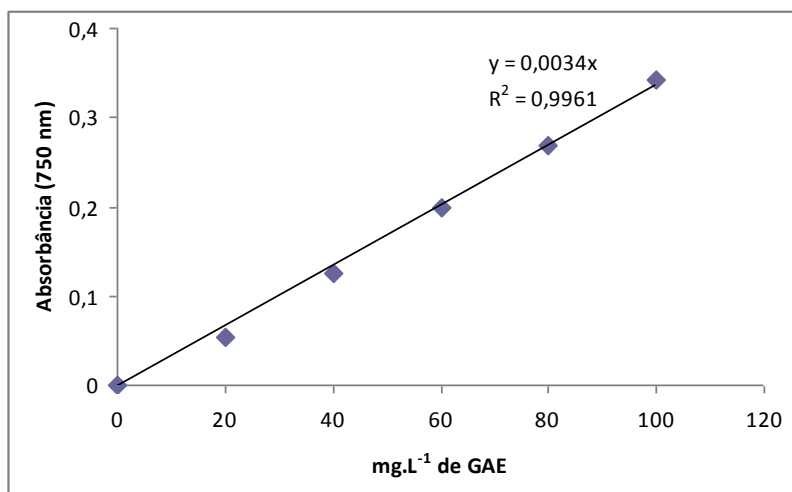


Gráfico 3. Curva padrão de ácido gálico (GAE) utilizada para determinação de compostos fenólicos.

n) Flavonóides

A análise de flavonóides foi realizada de acordo com a metodologia da ZHISHEN et al. (1999). Os flavonóides foram extraídos a partir de 5 g de farinha de pupunha com metanol a 80 %. A quantificação foi feita pela mistura de 1 mL da solução resultante da extração, 4 mL de água, 300 uL de Nitrito de sódio (NaNO_2) a 5 %, seguido de repouso por cinco minutos, adição de 300 uL de Cloreto de alumínio (AlCl_3) e repouso por seis minutos. Em seguida foi adicionado hidróxido de sódio (NaOH) 1 M e o volume completado com água para 10 mL em balão volumétrico. A leitura foi realizada a 510 nm. Foi preparada uma curva padrão com pirocatequina (GAE), nas concentrações de 0, 20, 40, 60, 80 e 100 mg.L^{-1} (Gráfico 4). Os resultados foram expressos mg.100g^{-1} de amostra fresca.

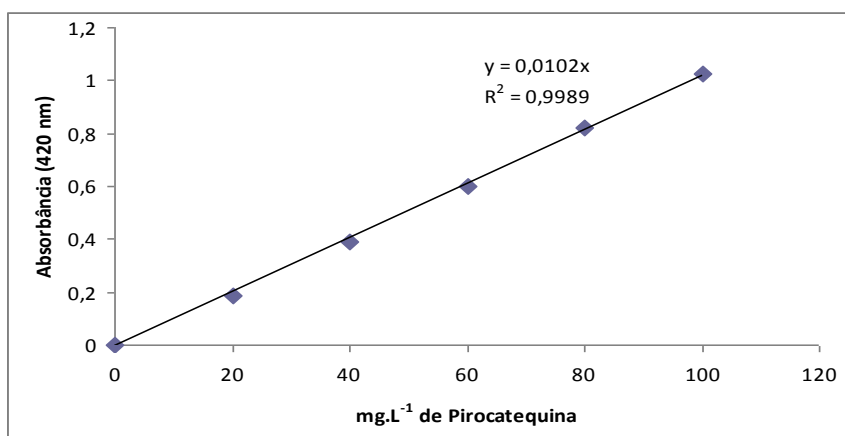


Gráfico 4. Curva padrão de pirocatequina utilizada para determinação de flavonóides.

5.6. PREPARO DAS BIOESFERAS

Os dois processos de fermentação em batelada foram conduzidos com leveduras *Saccharomyces cerevisiae* cervejeira, na forma livre e imobilizadas em alginato de cálcio (bioesferas) (PANTOJA, 2006). As bioesferas foram produzidas através da mistura composta da suspensão celular e alginato de cálcio 2 % (p/v), a qual foi gotejada em solução de CaCl_2 0,1 M, formando instantaneamente, por ligações eletrostática, as bioesferas de alginato de cálcio. As bioesferas formadas foram deixadas foram mantidas *over night*, a uma temperatura de $4\pm 1^\circ\text{C}$. A Figura 11 mostra o esquema do processo de obtenção das esferas.

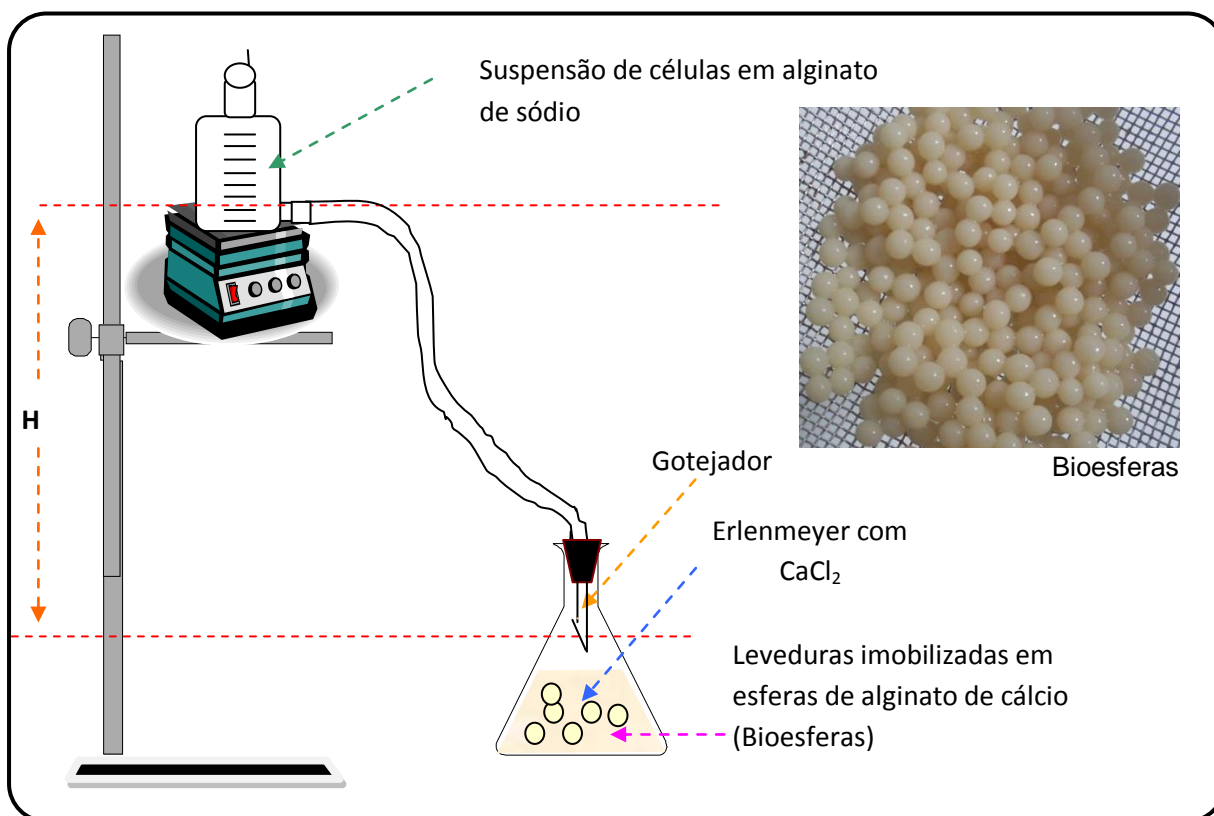


Figura 11. Esquema do processo de imobilização celular para obtenção das bioesferas de alginato de cálcio (Fonte: PANTOJA, 2006).

5.7. ELABORAÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

Para elaboração do mosto o malte foi triturado em moinho com um par de rolos (Figura 12), na Cervejaria do Gordo (Lorena-SP), com a finalidade de

obter um substrato com maior área de superfície exposta, aumentando assim, a hidrólise do amido durante a mosturação.



Figura 12. Moinho com um par de rolos (A) e malte moído (B).

Paralelamente, a farinha de pupunha foi adicionada de água e 1% de malte previamente triturado e, em seguida, submetidos à cocção a uma temperatura inicial de 65 °C por 10 minutos e posteriormente a 85 °C por 20 minutos e fervura por 40 minutos. Esse tratamento tem a finalidade de realizar hidrólise enzimática e exposição física de polissacarídeos como amido. Após uma delicada homogeneização a mistura (farinha de pupunha, porção de malte e água) foi direcionada a tina de mostura (Figura 13).



Figura 13. Tina de mostura (A), tina filtro (B) e cozinhador de mosto (C).

A mistura foi submetida a uma rampa de temperaturas em função do tempo (Gráfico 5), sendo, a primeira temperatura de controle de 42 °C por 20 minutos, para ativação das glucanases; a segunda de 55 °C por 20 minutos, para ativação das proteases; a terceira a 65 °C por 20 minutos para ativação da α -amilase e a quarta a 73 °C por 15 minutos, para ativação da enzima β -amilase. Após o processo de sacarificação o mosto foi submetido a temperatura de 78 °C para inativação das enzimas amilolíticas. O mosto é uma solução rica em açúcar e aminoácido que serve de base para fermentação alcoólica.

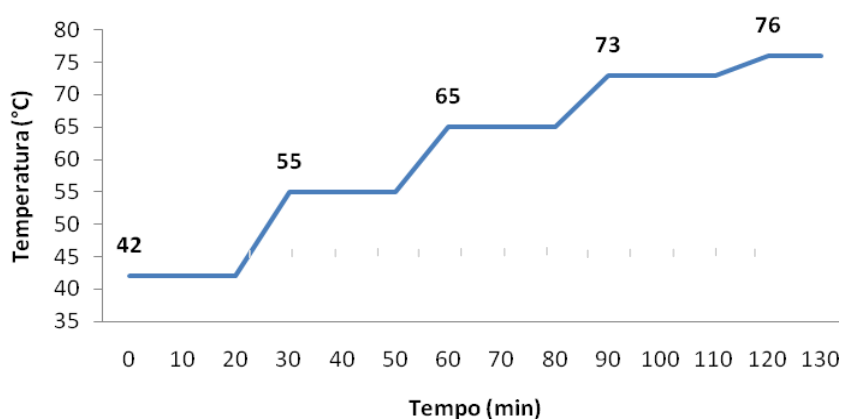


Gráfico 5. Rampa de mostura.

Após a mostura procedeu-se a filtração a qual foi realizada para separar o bagaço (parte sólida) do mosto (parte líquida), em tina filtro com fundo com ranhuras. Esse processo é conhecido como extração de mosto primário. O bagaço retido na filtração foi lavado com água quente (80 °C), para que houvesse o total arraste e diluição apropriada de açúcares fermentescíveis, constituindo no mosto secundário e em seguida pesado.

O mosto filtrado, constituído pelo mosto primário e secundário, foi levado para o cozinhador onde foi submetido à cocção (100 °C) por 90 minutos. Durante esta etapa foi adicionado o lúpulo amargor em pellets, que contém substâncias que, sob altas temperaturas, sofrem transformações químicas e conferem à cerveja o saboroma característico. O cozimento do mosto promoveu a sua esterilização, a coagulação de proteínas e a remoção de compostos voláteis indesejáveis. Após esta etapa o mosto passou por um

processo de decantação, processo que ocorre dentro do próprio cozinhador, para retirada de trub, uma mistura de proteínas coaguladas.

Após a decantação o mosto foi resfriado por um trocador de calor com placas verticais, onde saiu de 98 °C e atingiu a temperatura de 16 ± 1 °C, e foi conduzido para dois tanques fermentadores (Figura 14), até este momento o processo foi comum para ambos os tratamentos.



Figura 14. *Tanque fermentador com capacidade para 200 L.*

5.8. FERMENTAÇÃO DA CERVEJA

Durante a transferência para os tanques o mosto foi aerado para ativar a via respiratória das leveduras, essencial para o processo de multiplicação celular. Nessa fase, as leveduras consomem os açúcares fermentescíveis para

produzirem etanol (C_2H_5OH) e dióxido de carbono (CO_2) e também alguns ésteres, ácidos e alcoóis superiores que atribuem propriedades organolépticas à cerveja. A fermentação ocorreu a 15 °C, até atingir a redução do extrato aparente aos limites previamente estabelecidos, 2,5 °P.

5.8.1. Contagem de Células Vivas

A quantificação do número de células vivas foi realizada de acordo com a metodologia de ALVES e MORAES (1998). A contagem foi realizada a partir do fermento úmido (células livres) e das bioesferas, antes e após o inóculo e após a fermentação. A partir do fermento úmido foi pesado 10 g que foi diluído em 100 mL de água destilada e adicionado de cinco mL de azul de metileno, sendo classificadas como viáveis as células que não absorveram o corante e inviáveis as que apresentaram coloração azul. Em seguida procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer (Figura 15). A partir das bioesferas, 10 unidades foram diluídas em solução de ácido cítrico, contendo 5 mL de azul de metileno, completando-se o volume para 50 mL em balão volumétrico. A quantificação foi realizada como descrito acima e os valores obtidos foram expressos em percentual.

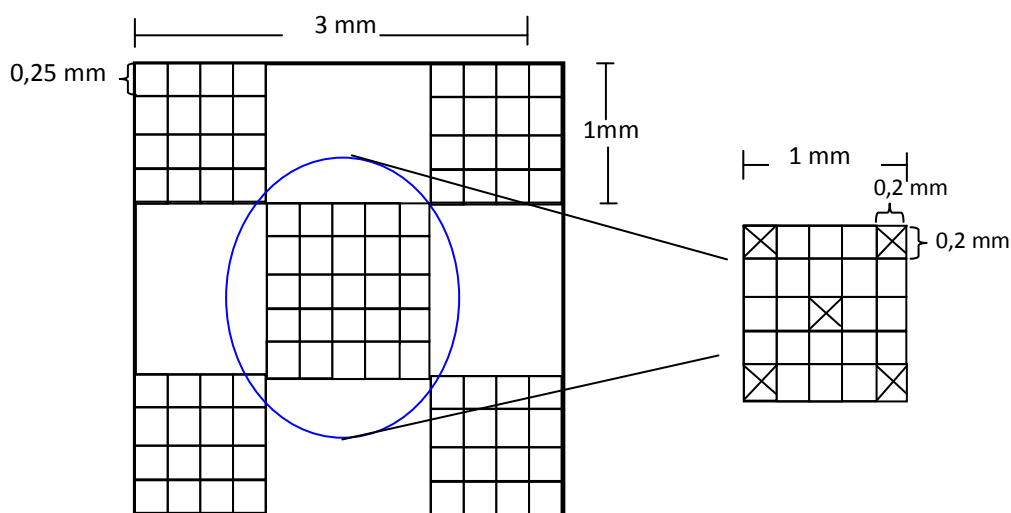


Figura 15. Desenho esquemático da câmara de Neubauer evidenciando a área de contagem de células. Fonte: PANTOJA (2006).

5.8.2. Monitoramento do Processo Fermentativo

Durante o processo fermentativo das cervejas foram coletadas alíquotas a cada 24 horas de fermentação dos processos conduzidos com células livres e imobilizados para as seguintes avaliações.

a) pH

A análise do pH foi realizada conforme metodologia do IAL (2008). Uma amostra de 50 mL de cerveja, em fermentação, foi coletada e submetida a leitura direta em pHmetro digital.

b) Extrato Original, Extrato Aparente, Fermentabilidade e Teor Alcoólico

As análises foram realizadas conforme a metodologia de EBC (1987), utilizando aparelho Beer Analyser (Figura 16), específico para leitura de cerveja, um equipamento multiparamétrico. Uma amostra de 200 mL de cerveja foi descarbonatada por agitação, em Erlenmeyer até completa eliminação dos gases presentes na cerveja e com auxílio de uma seringa, 10 mL de cerveja foram injetados no aparelho Beer Analyser II. Os resultados foram expressos em grau plato (°P) de extrato original e extrato aparente, percentual (%) para leitura da fermentabilidade e percentual de volume por volume (% v.v⁻¹) de teor alcoólico.



Figura 16. Aparelho Beer Analyser, utilizado para determinação do teor de extrato original e aparente, fermentabilidade e teor alcoólico da cerveja.

5.8.3. Variáveis de Resposta do Bioprocesso

Quanto às variáveis de respostas do bioprocessamento temos: fator de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$), fator de rendimento de células em relação ao substrato ($Y_{X/S}$), produtividade volumétrica (Q_p), taxa específica de crescimento celular (μ_x) e eficiência fermentativa (EF).

a) Fator de Rendimento de Produção de Etanol ($Y_{P/S}$)

O fator de rendimento de produção de etanol foi calculado pela relação entre gramas de etanol produzido e açúcares totais consumidos ($g_P g_S^{-1}$). Através da relação entre a concentração do produto final pela diferença da concentração do substrato inicial e concentração do substrato final. O resultado foi expresso em $g.L^{-1}$. O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{-(S - S_0)} = \frac{P}{S_0 - S}$$

Onde:

- P = Concentração de produto final ($g.L^{-1}$)
- P_0 = Concentração de produto inicial ($g.L^{-1}$)
- S = Concentração do substrato final ($g.L^{-1}$)
- S_0 = Concentração de substrato inicial ($g.L^{-1}$)

b) Fator de Rendimento de Células em Relação ao Substrato ($Y_{X/S}$)

O rendimento foi calculado em gramas de células por grama de extrato consumido ($g.g^{-1}$), através da relação entre a variação da concentração do produto pela variação da concentração de substrato negativo. O resultado foi expresso em $g.L^{-1}$. O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{-\Delta S} = \frac{X - X_0}{-(S - S_0)}$$

Onde:

- X = Massa Celular Final ($g.L^{-1}$)
- X_0 = Massa Celular Inicial ($g.L^{-1}$)
- S = Conc. do substrato final ($g.L^{-1}$)
- S_0 = Conc. de substrato inicial ($g.L^{-1}$)

c) Produtividade Volumétrica (Qp)

Foi quantificada em gramas de etanol produzida por Litro de meio fermentado por hora ($g_P L^{-1}.h^{-1}$). Através da divisão do valor em $g.L^{-1}$ de etanol, na cerveja, pelo tempo em horas de fermentação. O resultado foi expresso em $g.L^{-1}$. O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Qp = \frac{P}{t}$$

Onde:

- $P =$ Produto (etanol) ($g.L^{-1}$)
- $t =$ Tempo de fermentação em horas (h)

d) Taxa Específica de Crescimento Celular (μ_x)

Foi calculado com base nas massas celular final, celular inicial e tempo, levando em consideração as células viáveis. O resultado foi expresso em $g.L^{-1}$. O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu_x \cdot t$$

Onde:

- X (g/L) = Massa celular final
- X_0 (g/L) = Massa celular inicial
- t (h) = Tempo

e) Eficiência Fermentativa (EF).

A relação entre o rendimento em produto do processo ($Y_{P/S}$) e o rendimento teórico determinaram a eficiência do processo fermentativo do mosto para elaboração da cerveja. O resultado foi expresso em porcentagem de Eficiência de Fermentação. O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$EF = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \cdot 100$$

Onde:

- $EF =$ Eficiência fermentativa
- $Y_{P/S} =$ Rendimento em produto.

5.9. CERVEJA EM FINAL DE FERMENTAÇÃO

Ao término do processo de fermentação as leveduras livres foram retiradas por decantação pelo cone inferior do tanque de fermentação, já as bioesferas de levedura foram retiradas por filtração em peneira de aço inoxidável com malha de 0,5 cm de diâmetro, previamente esterilizada. Ambos foram armazenados sob refrigeração, para posterior reutilização, se necessário. O líquido resultante da fermentação após retirada das células, ou cerveja fermentada, foi resfriado para condução do processo de maturação.

5.10. MATURAÇÃO DA CERVEJA

A maturação da cerveja foi conduzida a cerca de 1 °C por 2 dias. Após esta etapa a bebida foi filtrada com terra infusória diatomácea e em seguida, acondicionada em garrafas de vidro de 600 mL e então, submetidas a pasteurizadas a 60°C, por 30 minutos. O produto final foi caracterizado quanto sua composição físico-química, microbiológica e sensorial.

5.11. OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA CERVEJA

5.11.1. Caracterização Físico-química

a) Potencial Hidrogeniônico (pH)

As análises do potencial hidrogenioco da cerveja foram realizadas por leitura direta em pHmêtro conforme a metodologia descrita pelo IAL (2008). Os resultados foram expressos em número inteiro seguido da sigla pH.

b) Extrato aparente, extrato real, fermentabilidade e teor alcoólico

As análises foram realizadas conforme descrito no item 5.2.7.2.

c) Dicetonas totais

A análise foi realizada conforme metodologia da European Brewery Convention - EBC (1987). Foi realizada a partir da destilação de uma solução

contendo 100 mL de cerveja e de 25 mL de água destilada. Foram coletados 24 mL da amostra destilada que, em seguida, foi transferida para um balão de 25 mL e avolumada com água destilada. A partir desta solução, foram pipetados 10 mL de amostra em um tubo de ensaio que foi acrescentado com 0,5 mL de solução de orto-fenilidiamina. Após repouso de 35 minutos foram adicionados 2 mL de HCl 4 M seguido de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a um comprimento de onda de 335 nm. Os resultados foram expressos em mg.L^{-1} , segundo o cálculo:

$$\text{Dicetonas Totais (mg.L}^{-1}\text{)} = A \cdot 2,4 \cdot f$$

Onde:

- A = Absorbância da leitura
- f = fator determinado através da calibração do espectrofotômetro

d) Amargor

A análise foi realizada conforme metodologia da EBC (1987). Uma gota de álcool 1-octílico foi gotejada em uma proveta e, em seguida, misturada com 10 mL de cerveja. Essa mistura foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL com rolha, contendo uma tira plástica e 3 pérolas de vidro com a finalidade de manter o processo bifásico. Em seguida foi adicionado de 0,5 mL de HCl 6 M e 20 mL de isoctano, após ser tampado procedeu-se com a agitação por 20 minutos em agitador orbital a 180 rpm, sendo este processo facilitado pelas pérolas de vidro adicionadas a mistura anteriormente. Em seguida, a fração superior (límpida) da solução bifásica foi transferida para um tubo de ensaio com tampa rosqueada. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 275 nm. O cálculo utilizado para verificação do amargor foi realizado conforme a equação descrita a seguir:

$$\text{BU} = A \times f \times 50$$

Onde:

- A = Absorbância da leitura
- f = fator determinado através da calibração do espectrofotômetro

e) Cor

A determinação da cor da cerveja foi realizada por espectrofotometria seguindo o método EBC (1987). A absorção de luz é medida num comprimento de onda de 430nm. O método requer que as amostras analisadas sejam filtradas e que apresentem turbidez inferior a 1 EBC. Uma amostra de 400 mL de cerveja foi descarbonatada e filtrada com terra diatomácea infusória, a partir do filtrado procedeu-se a leitura.

f) Gás Carbônico (CO₂)

A análise foi realizada seguindo a metodologia descrita por MEBAK (1987). Para a realização da análise de CO₂ foi utilizado aparelho medidor de ar e CO₂ com manômetro (Zahm Modified Piercing Device). A garrafa de 600 mL contendo cerveja foi posicionada no aparelho e após o furo da tampa, quando o aparelho detecta uma pressão constante, foi realizada a leitura. Os resultados foram expressos em % CO₂ p.p⁻¹. A correção da pressão foi realizada de acordo com o cálculo a seguir:

$$PCO_2 = PM - f$$

Onde:

- PCO_2 = Pressão de CO₂ corrigida (% p.p⁻¹)
- PM = Pressão no manômetro
- f = Fator de correção da altitude utilizando tabela de correção

f) Turvação em 24h

A análise foi realizada conforme a metodologia da EBC (1987). Uma amostra de 100 mL de cerveja foi colocada em banho de álcool a 0 °C por um período de 24 horas. Em seguida, foi retirada do banho e procedeu-se a leitura em aparelho turbidímetro. Os resultados foram expressos em EBC.

5.11.2. Avaliação Microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas a partir de alíquotas das cervejas acondicionadas em garrafas submetidas a pasteurização.

a) Contagem Total de Bactérias Lácticas

A análise foi realizada conforme metodologia (SILVA ET AL., 1997). Para determinação da contaminação da cerveja por bactérias lácteas uma amostra de 1 mL de cerveja foi inoculada em meio de cultura Raka Roy. O meio foi preparado conforme descrição do fornecedor do meio de cultura. Para o preparo do meio de cultura utilizado para identificação de bactérias lácteas foram pipetados 10 mL de Mono-Oleato de Sorbitan e 7 mL de solução de actidiona 0,1% e o pH foi corrigido para 5,4 com H_2SO_4 1 N.

A mistura foi dissolvida até o ponto de ebulição, em seguida, distribuída em placas de Petri e esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento foi adicionado 1 mL de 2-feniletanol, com cuidados assépticos e procedeu-se o inóculo. O meio foi colocado em uma incubadora a 30 °C por 7 dias para verificação do desenvolvimento das bactérias lácteas. A leitura foi realizada através da contagem de colônias desenvolvidas e o resultado expresso em UFC.mL⁻¹.

b) Contagem de Bactérias Gram-negativas

A análise foi realizada conforme metodologia (SILVA ET AL., 1997). Para determinação da contaminação da cerveja por bactérias gram-negativas (BGN) uma amostra de 1 mL de cerveja foi inoculada em meio de cultura WLN. O meio foi preparado conforme descrição do fornecedor do meio de cultura. Para o preparo do meio de cultura para identificação de BGN foram pesados 7,5 g de meio de cultura que foi dissolvido 100 mL de água destilada.

O pH foi corrigido com NaOH 1 M até atingir pH 5,5. A mistura foi dissolvida até ebulição, em seguida, distribuída em placas de Petri e esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O meio foi colocado em uma incubadora a 30 °C por 7 dias para verificação do desenvolvimento de bactérias gram-negativas. A leitura foi realizada através da contagem de colônias desenvolvidas e o resultado expresso em UFC.mL⁻¹.

c) Contagem de Leveduras Selvagens

A análise foi realizada conforme metodologia (SILVA ET AL., 1997). Para determinação da contaminação da cerveja por leveduras selvagens, ou seja, qualquer levedura diferente da utilizada no processamento da cerveja, uma amostra de 1 mL de cerveja foi inoculada em meio de cultura YM com CuSO_4 . O meio foi preparado conforme descrição do fornecedor do meio de cultura. Para o preparo do meio de cultura para identificação de leveduras selvagens foram pesados 4,1 g de meio de cultura que foi dissolvido 100 mL de água destilada.

A mistura foi dissolvida até ebulição, em seguida, distribuída em placas de Petri e esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Adicionar sulfato de cobre ao meio com 50 mL.L⁻¹. O meio foi colocado em uma incubadora a 10 °C por 7 dias para verificação do desenvolvimento de leveduras selvagens. A leitura foi realizada através da contagem de colônias desenvolvidas e o resultado expresso em UFC.mL⁻¹.

5.11.3. Análise Sensorial

As análises sensoriais de preferência e aceitabilidade foram realizadas com a participação de 40 pessoas não treinadas de acordo com a metodologia de MONTEIRO (1984). As pessoas que participaram das análises sensoriais tinham faixa etária entre 18 e 55 anos, ficando altamente restrita a participação na degustação por provadores menores de 18 anos.

Foram excluídas do quadro de avaliadores pessoas com faixa etária superior a 60 anos, além de fumantes, pessoas com algum problema de saúde que interferisse na idoneidade da avaliação da cerveja, como, gripe, resfriado, problemas gástricos, diabetes, hepatite, infamações dentárias ou qualquer outro. Ressalta-se, no entanto, que não lhes foi negado o direito de provar do produto, porém sua opinião não foi validada.

Para a avaliação sensorial foram oferecidas três amostras de cervejas, sendo: a) cerveja elaborada com leveduras na forma livre; b) cerveja elaborada com leveduras imobilizadas em alginato de cálcio e c) cerveja padrão tipo puro malte. Esta última foi empregada para fins comparativos, visando

principalmente obter respostas de quanto às cervejas produzidas eram diferentes ou iguais, ou mais aceitáveis ou menos aceitáveis que uma cerveja já conhecida.

Para degustação foi oferecido para os participantes 50 mL de cada amostra de cerveja, servida diretamente da chopeira a uma temperatura aproximada de 1 ± 1 °C em copos de acrílico transparentes. Os testes foram realizados em cabines apropriadas para avaliação sensorial com luz branca. Os testes foram avaliados com auxílio de fichas sensoriais (Figura 17), entregues no início da degustação. Os participantes foram instruídos quanto ao preenchimento da ficha e quanto ao procedimento de avaliação, sendo necessário enxágue bucal com água a cada mudança de amostra.

Nome: _____ Data: _____ Idade: _____
 Fumante? () Sim () Não Diabético? () Sim () Não
 Por Favor, avalie cada amostra utilizando a escala abaixo para descrever o quanto você gostou ou desgostou dos produtos.

() Prod 1
 () Prod 2
 () Prod 3

Sugestões:

Nota	Atributo
9	Excelente
8	Ótimo
7	Bom
6	Agradável
5	Normal
4	Desagradável
3	Indiferente
2	Ruim
1	Péssimo

Figura 17. Ficha sensorial aplicada para as avaliações de preferência e aceitabilidade das cervejas tipo lager elaborada com farinha de pupunha como adjunto e conduzidas por processos fermentativos com leveduras livres e imobilizadas.

5.12. ETAPA GERAL DO PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJAS

As etapas do processo para produção de cerveja, utilizando como fonte secundária de carboidratos fermentescíveis (adjunto) a farinha de pupunha e conduzidas por processos fermentativos com leveduras livres e imobilizadas estão resumidas na Figura 18.

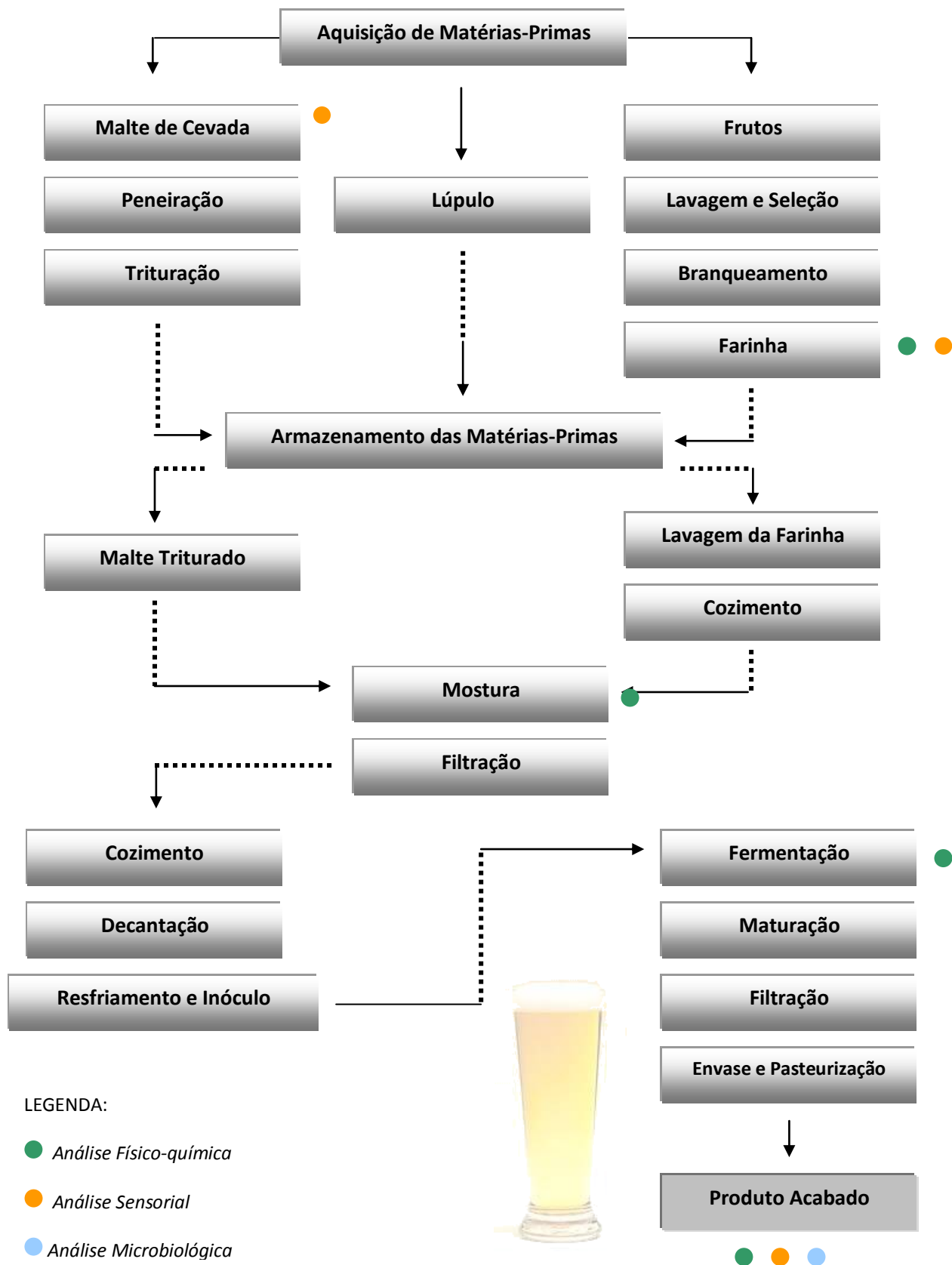


Figura 18. Fluxograma do processo de produção da cerveja de pupunha, utilizando leveduras imobilizadas, com suas respectivas etapas e análises.

5.13. AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Os dados das variáveis físico-químicas da cerveja como produto acabado foram analisadas estatisticamente pelo Teste T com nível de significância de 0,05 comparando duas amostras (cerveja com levedura livre e com levedura imobilizada), em triplicata.

5.14. LABORATÓRIOS E INSTITUTOS

O projeto de dissertação foi realizado em parceria com diferentes Instituições e empresa como mostrado a seguir (Figura 19).

a) Laboratório de Alimentos e Nutrição (LAN/INPA)

No laboratório de alimentos e nutrição do, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (LAN/INPA), localizado na cidade de Manaus/AM, foram realizadas as etapas de beneficiamento dos cachos de pupunha e elaboração da farinha de pupunha; além dos testes microbiológicos da cerveja.

b) Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação (LBB/UFVJM)

No laboratório de bioprocessos e biotransformação da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (LBB/UFVJM), localizado na cidade de Diamantina/MG, foram realizadas as etapas de caracterização físico-química da farinha de pupunha, pré-testes de formulações da cerveja (teste de mostura) e de imobilização celular.

c) Micro Cervejaria (EEL/USP)

Na microcervejaria da Escola de Engenharia de Lorena, da Universidade de São Paulo (EEL/USP), localizada na cidade de Lorena/SP, foram realizadas as etapas de imobilização celular, elaboração das cervejas com leveduras livres e imobilizadas e análises físico-químicas e sensoriais.

d) Escola Superior em Ciências da Saúde (ESA/UEA)

Na Escola Superior de Ciências da Saúde da Universidade do Estado do Amazonas (ESA/UEA), localizada na cidade de Manaus/AM foram cumpridos os créditos obrigatórios para a obtenção do título de mestre em Biotecnologia.



Figura 19. Laboratório e Institutos onde foram realizadas partes dos experimentos relacionados ao projeto de elaboração de cervejas tipo lager conduzidas com células livres e imobilizadas, utilizando como adjunto a farinha de pupunha. Laboratório de Alimentos e Nutrição - LAN/INPA (A); Laboratório de Bioprocessos e Biotransformação - LBB/UFVJM (B), Micro Cervejaria - EEL/USP (C), Universidade do Estado do Amazonas – UEA (D).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. PUPUNHA (*Bactris gasipaes* Kunth)

6.1.1. Caracterização Física dos Frutos

A coloração dos frutos analisados variou entre verde, amarelo, alaranjado e vermelho, e a polpa apresentava coloração alaranjada típica. Os frutos apresentavam um epicarpo coriáceo e oleoso que se destacou facilmente da polpa. Quanto a sua morfologia os frutos apresentaram formato redondo a oval. Todas estas características variam conforme a espécie, climatologia do ambiente, fatores genéticos e qualidade do solo. Os frutos foram selecionados aleatoriamente e apresentaram altura média de $37,6 \pm 0,12$ mm, diâmetro médio de $35,9 \pm 1,04$ mm e peso médio de $34,9 \pm 0,23$ g.

6.1.2. Rendimento em Polpa e em Farinha

Os valores de rendimento em polpa a partir do fruto, da farinha a partir da polpa e da farinha a partir do fruto estão inseridos na Tabela 1.

O rendimento em polpa do fruto foi de 76,1 %, sendo as perdas obtidas em função da retirada do ápice e base; cozimento, o qual lixívia compostos químicos como, lipídios, carboidratos, proteínas, dentre outros e retirada da

casca e semente. O resultado obtido foi superior ao rendimento encontrado por PANTOJA et al. (2001) que reportam rendimento em polpa de 71,2 %.

O rendimento em farinha a partir da polpa foi de 44,1 %, nesta etapa, as perdas estão relacionadas com o processo de desidratação, trituração e peneiração da farinha. Considerando-se o rendimento total a partir do fruto inteiro *in natura* até farinha, o resultado obtido foi de 33,6 %. Esse resultado reúne todas as perdas possíveis ocorridas durante o processamento do fruto em farinha. A Tabela 1 apresenta todos os valores obtidos de rendimento obtidos nas diferentes etapas de processamento do fruto *in natura* inteiro até farinha.

Tabela 1. Rendimentos obtidos durante as etapas de processamento do fruto *in natura* em polpa; da polpa em farinha e rendimento total do fruto inteiro *in natura* em farinha.

Rendimento	(%)
Fruto em Polpa	76,1
Polpa em Farinha	44,1
Fruto em Farinha (Total)	33,6

6.1.3. Características Físico-químicas da Farinha de Pupunha

Durante o processamento da farinha de pupunha diversas alterações ocorrem na sua composição físico-química, as variáveis de maior influência neste processo estão relacionadas aos efeitos da temperatura de cozimento e desidratação. A composição físico-química da farinha de pupunha está descrita na Tabela 2.

A farinha de pupunha apresentou baixa umidade com 2,83 %, valor característico desse tipo de matéria-prima. A baixa umidade impede o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e disseminação de pragas como insetos, prolongando seu tempo de vida útil. O armazenamento da pupunha na forma de farinha é vantajoso para as indústrias alimentícias, permitindo sua utilização durante todo o ano e de fácil armazenamento quando comparado à forma de polpa. Do ponto de vista industrial frutos que

apresentam maior conteúdo de matéria seca, apresentam um maior rendimento e, portanto, menor quantidade de água residual (LEONEL et al., 1998).

Tabela 2. Caracterização físico-química da farinha de pupunha (g.100g⁻¹).

Físico-química	Média ± DP*
Umidade (g.100g ⁻¹)	2,83 ± 0,03
Cinzas (g.100g ⁻¹)	1,40 ± 0,03
Lipídeos (g.100g ⁻¹)	12,92 ± 0,74
Fibras Totais (g.100g ⁻¹)	5,19 ± 0,39
Proteínas (g.100g ⁻¹)	4,89 ± 0,14
Carboidratos (g.100g ⁻¹)	71,78 ± 1,09
Valor Energético (kcal/100g)	422,99 ± 2,88
Amido (g.100g ⁻¹)	60,65 ± 4,41
Açúcares Não Redutores Totais - ANRT (g.100g ⁻¹)	2,78 ± 0,01
Açúcares Redutores - AR (g.100g ⁻¹)	1,52 ± 0,07
Açúcares Redutores - ART (g.100g ⁻¹)	4,30 ± 0,07
Compostos Fenólicos (mg.100g ⁻¹)	88,74 ± 1,37
Flavonóides (mg.100g ⁻¹)	14,52 ± 0,25
Antocianinas (mg.100g ⁻¹)	Não encontradas
Sólidos Solúveis Totais (°Brix)	1,70 ± 0,08
Acidez (g.100g ⁻¹)	0,15 ± 0,01
Grau de doçura	11,77 ± 1,05
Potencial hidrogênionico (pH)	5,74 ± 0,01

*DP = Desvio Padrão

Os percentuais de cinzas referem-se ao resíduo inorgânico remanescente da queima da matéria orgânica, sem resíduo de carvão. Na farinha foram encontrados 1,40 % de cinzas, valores mais elevados foram encontrados por YUYAMA et al. (1999), com 2,91 %, selecionando diversas espécies de pupunha para elaboração de ração animal, no Amazonas. Geralmente, a cinza contém cálcio, magnésio, ferro, fósforo, chumbo, cloreto, sódio e outros componentes minerais.

Quanto ao teor de lipídeos obteve-se 12,92 %, o que representa um valor duas vezes maior que o encontrado por PANTOJA et al. (2001), 5,9 %. O alto teor de lipídios pode causar em bebidas características indesejáveis, sabor desagradável e rancidez. Além disso, em fruto é inversamente proporcional ao de carboidratos, que são constituintes importantes no processo fermentativo para a obtenção de álcool. A farinha apresentou 5,19 % de fibras totais valor 4,67 vezes maior que o encontrado por FERREIRA e PENA (2003), 1,1 %.

As proteínas encontradas na farinha foram 4,89 %, destes 0,78 % foi de nitrogênio. As proteínas são compostos orgânicos de alto peso molecular formada por uma seqüência de aminoácidos através de ligações peptídicas. O malte contém dois grupos principais de enzimas que catalisam estas ligações, o grupo das exopeptidases e endopeptidases. Após a clivagem disponibilizam aminoácidos que servirão de alimento para as leveduras no processo de fermentação. Cabe ressaltar que, a quantidade de nitrogênio disponível na cerveja no final do processo de fermentação é de extrema importância por estar relacionada com a formação de partículas que provocam a turvação da cerveja.

Os carboidratos são os constituintes mais abundantes nos vegetais chegando a representar 50 a 80 % do peso seco. Eles são importantes fontes de energia e compõem a parte estrutural das células. A partir dos resultados obtidos pode-se observar que grande parte da farinha é formada por carboidratos, compreendendo 71,78 %. FERREIRA e PENA (2003) analisando farinha de pupunha de frutos coletados em feiras em Belém (PA) encontraram 64,7 %. Esta diferença se deve as diferentes condições climáticas dos ambientes e de fatores genéticos das plantas. PANTOJA (2000) reportou que o processo de cozimento dos frutos de pupunha implica na perda de açúcar e ocasiona perda de amido, e que isso se deve a um tipo de dextrina formado durante o cozimento prolongado, que apresenta solubilidade em água.

Esse grande percentual de carboidratos servirá como fonte de nutriente para as leveduras no processo de fermentação do mosto cervejeiro. A riqueza em carboidratos é importante característica em matérias-primas para a elaboração de cervejas, portanto a farinha de pupunha pode ser utilizada como adjunto no mosto cervejeiro. Dentro do grupo dos carboidratos a predominância

foi de amido com 60,65 g em 100 g de farinha. Os demais açúcares encontrados estão divididos em açúcares redutores (AR) com 1,52 g e açúcares não redutores totais (ANR) com 2,78 g.

O valor energético obtido na farinha de pupunha foi de 422,99 kcal.100g⁻¹.

A farinha apresentou 88,74 mg.100g⁻¹ de compostos fenólicos (CF), onde 14,52 mg.100g⁻¹ são de flavonóides. Os compostos fenólicos influenciam no saboroma cerveja e estão diretamente relacionados com a turvação deste produto, por se associarem as proteínas remanescentes neste meio. Quanto ao teor de antocianinas não foi detectado a presença deste composto na farinha de pupunha. O teor de sólidos solúveis totais disponíveis encontrados foi de 1,70 °Brix, o que evidencia o baixo teor de açúcares e acidez do fruto.

A farinha de pupunha apresentou baixa acidez com 0,15 g.100g⁻¹ e potencial hidrogênico de 5,74 pH. Portanto, essas características demonstram que o fruto não é ácido. O grau de doçura é a relação entre o teor de sólidos solúveis totais e a acidez da farinha, neste foram encontrados valores de 11,77 °Brix/acidez, quanto maior o valor obtido, mais doce é o produto avaliado. Como exemplo, podemos citar a manga espada (*Mangifera indica* L.) que apresenta 44,82 de °Brix/acidez (FURTADO et al., 2009), o que mostra que o grau de doçura da pupunha é muito baixo.

6.2. AVALIAÇÃO DO MALTE DE CEVADA E DA FARINHA DE PUPUNHA

Os resultados das avaliações do malte e farinha de pupunha estão apresentados na Tabela 3. Os resultados referentes ao teste do chá típico e parasita vivo ausente foram satisfatórios. Quanto ao aspecto morfológico, o malte apresentou aspecto típico (Figura 20).



Figura 20. Malte avaliado durante o teste de parasita.

Tabela 3. Avaliação do malte e da farinha de pupunha.

Avaliação	Malte	Farinha de Pupunha
Teste do Chá	Típico	Típico
Parasita Vivo	Ausente	Ausente
Aspecto Morfológico	Típico	nd

nd = não determinado

6.3. MOSTO CERVEJEIRO

Os resultados das rampas de temperatura do cozimento do adjunto farinha de pupunha e da mostura estão apresentados no Gráfico 6. Os resultados evidenciam que não houve alteração fora da faixa desejada de temperatura durante o processo de mosturação. Este fato foi satisfatório, uma vez que alterações nas temperaturas interferem diretamente no desempenho do processo, pois afetam na função catalítica das enzimas.

Após a última etapa da mostura foi realizado o teste do iodo. O resultado obtido foi iodo negativo o que mostra que o amido foi degradado em polímeros de baixo peso molecular.

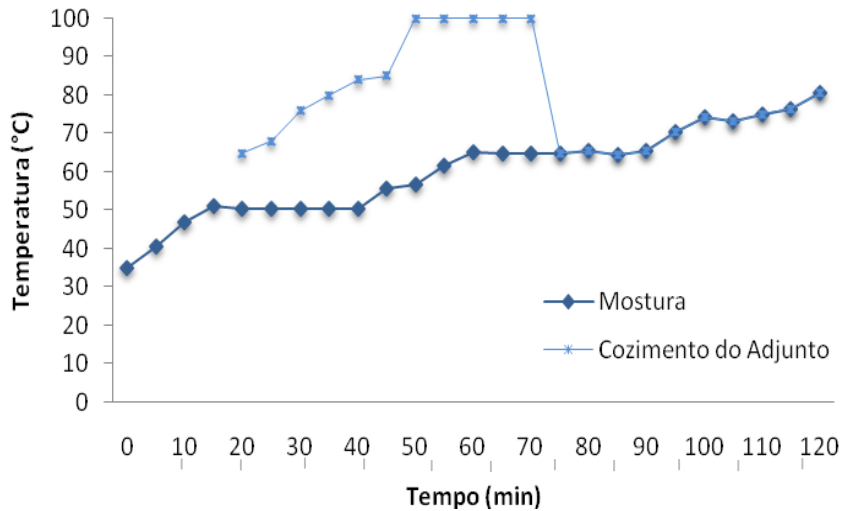


Gráfico 6. *Curvas de temperaturas de mosturação e cozimento do adjunto de farinha de pupunha, com rampas e repousos.*

A Figura 21 mostra as características do mosto em elaboração no interior da tina de mostura sendo levemente homogeneizado. Observa-se os sólidos em suspensão no mosto os quais constituíram o bagaço.



Figura 21. *Processo de mosturação com adjunto de farinha de pupunha, mostrando sólidos em suspensão que originaram o bagaço. Na figura o bagaço (pontos escuros) se diferencia do mosto pela sua coloração mais escura. Na parte central encontra-se a espuma formada durante a agitação do mosto.*

No interior da tina filtro observa-se uma torta formada por **bagaço** (Figura 21), composta por uma mistura de cascas de malte e resíduos de farinha, que formaram o leito filtrante no interior desta. Este equipamento possui um fundo com ranhuras e uma série de facas verticais que realizam corte na torta sempre que a filtração estiver cessando. Ao término da filtração de 200 L de mosto sobraram 36,7 kg de torta, que foi retirada do processo neste momento. O bagaço não pôde passar pelo processo de cozimento para que não fosse extraída nenhuma substância que interferisse no saboroma da cerveja.



Figura 22. Bagaço retido no interior da tina filtro após etapa de filtração do mosto, formando o leito filtrante.

A etapa de cozimento do mosto apresentou extrato inicial de 11,02 °P e final de 11,84 °P, característico de mostos obtidos por tecnologia *normal* (mosto com concentração de extrato abaixo de 12 °P). Após o resfriamento o mosto (Figura 23) apresentou coloração vermelha-alaranjada característica do fruto de pupunha e temperatura de 17,5 °C.



Figura 23. *Aspecto do mosto frio antes do processo fermentativo.*

6.4. IMOBILIZAÇÃO CELULAR E INÓCULO DE CÉLULAS NO MOSTO

Antes do inóculo, as leveduras livres e imobilizadas (Figura 24) foram quantificadas quanto ao percentual de células vivas (Tabela 4 e Figura 25). Pois valores inferiores a 90 % tornam a fermentação mais lenta. No início do processo fermentativo conduzidos com leveduras livres o percentual de células livres **vivas** foi de 98 % e nas bioesferas o percentual de células vivas foi de 96 %. Após serem retiradas dos tanques fermentadores o número de células livres vivas foi de 95 % e nas bioesferas de 91 %.

Tabela 4. *Resultados da contagem de células vivas no início e final do processo fermentativo de obtenção das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzido com leveduras na forma livre e imobilizada.*

<i>Leveduras</i>	<i>Células vivas(%)</i>	
	<i>Início</i>	<i>Fim</i>
<i>Livre</i>	98,00	95,00
<i>Imobilizada</i>	96,00	91,00

Problemas com controle de temperatura nos tanques como choques térmicos (decréscimo de temperatura com até 2 °C em pelo menos 24 h), elevado tempo de permanência no tanque, elevado número de reutilização das leveduras, entre outros, inviabilizam as células, podendo levá-las a autólise (morte celular) ou modificações morfológicas, aumentando consideravelmente o tempo de fermentação.



Figura 24. Leveduras imobilizadas submersas no mosto antes de serem inoculadas no tanque fermentador.

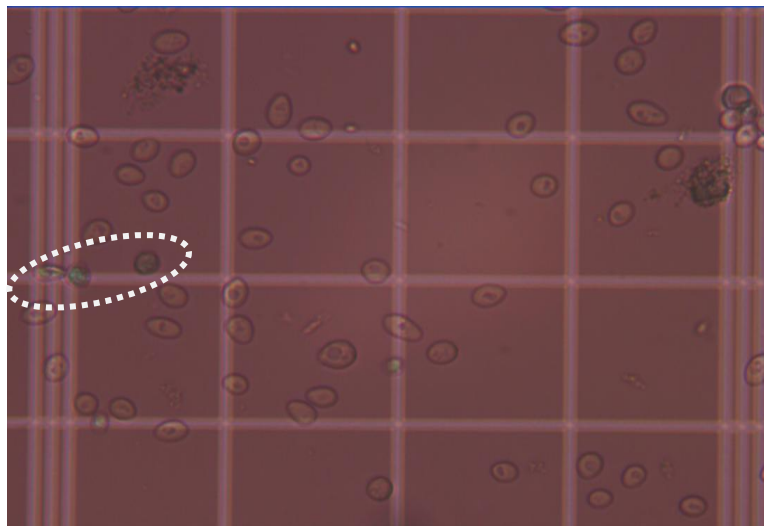


Figura 25. Leitura de células por microscopia em câmara de Neubauer para determinação do percentual de células vivas. Em destaque células mortas coradas por azul de metileno.

6.5. FERMENTAÇÃO E MATURAÇÃO DA CERVEJA

A fermentação iniciou com temperatura de 16 °C no tanque fermentador com processo usando leveduras livres e 17,1 °C no tanque com leveduras imobilizadas. Todo o processo de fermentação aconteceu com temperaturas entre 16 – 17 °C, por um período de 4 dias, onde houve estabilização do extrato aparente e etanol.

As leveduras na forma livre após a retirada do tanque fermentador apresentaram compactação de 36,5 %, representando 1,93 % de perda de extrato (perda de cerveja), nesta etapa o rendimento em bebida foi de 98,07 %. A bebida com leveduras imobilizadas apresentou 0,98 % de perda de extrato devido ao processo de filtração das bioesferas não apresentou perda significativa, tendo rendimento em bebida de 99,03%. Portanto, a bebida com leveduras imobilizadas apresentou menores perdas durante este processo.

Os resultados da curva de temperatura ao longo do processo de fermentação e maturação estão dispostos nos Gráficos 7 e 8. Não houve choque térmico, ou seja, mudança brusca de temperatura no interior dos tanques fermentadores nos dois processos de obtenção das cervejas.

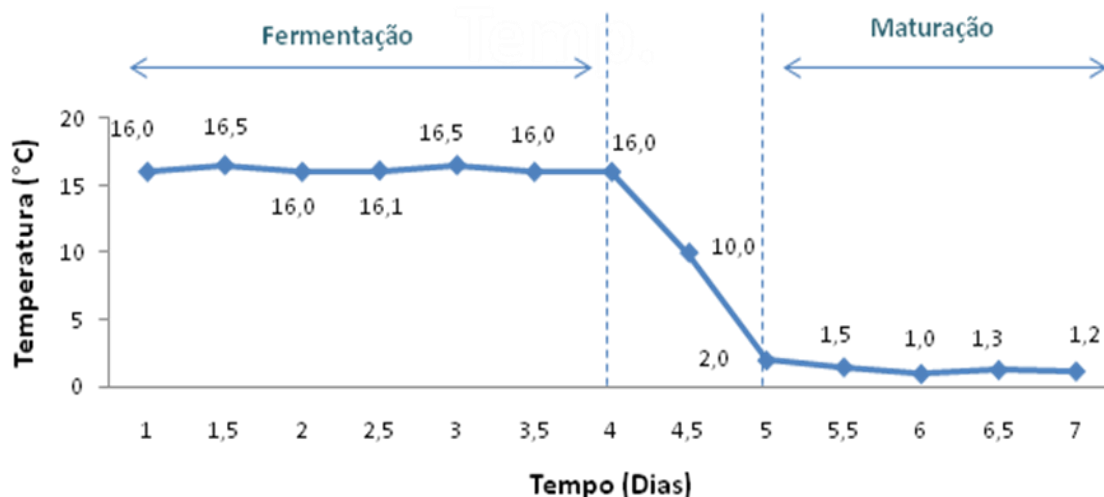


Gráfico 7. Temperaturas de fermentação e maturação da cerveja utilizando como adjunto farinha de pupunha conduzido por processo fermentativo com leveduras na forma livre.

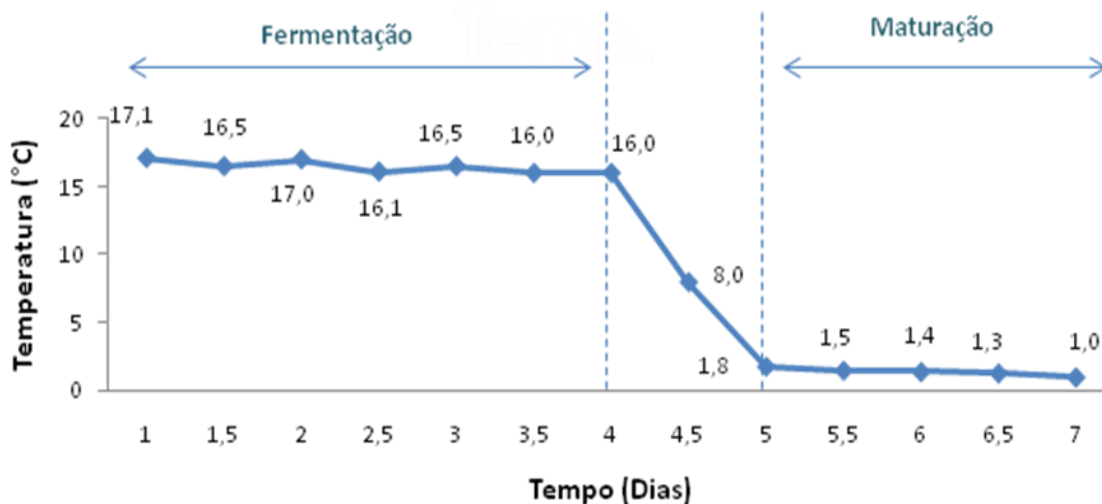


Gráfico 8. Temperaturas de fermentação e maturação da cerveja utilizando como adjunto farinha de p7punha conduzido por processo fermentativo com leveduras na forma imobilizada em alginato de cálcio.

O cálculo do percentual de fermentação do mosto ao longo do processo está representado nos Gráficos 9 e 10. No processo conduzido por leveduras livres (Gráficos 9) atingiu-se valores próximos de 40 % de fermentabilidade após 3 dias de processo. No processo conduzido por leveduras imobilizadas (Gráficos 10) o grau de fermentabilidade reportado anteriormente foi alcançado em dois dias de fermentação, caracterizando uma fermentação mais rápida e evidenciando a boa adaptabilidade das leveduras imobilizadas ao meio. Este fato pode ainda estar relacionado a forma de inóculo da levedura, que por encontrar-se dentro das esferas estão menos susceptíveis a ação das variáveis físicas e químicas do meio.

A fermentação máxima atingiu valores acima de 70 % com 3,5 dias no processo com leveduras livres e com 2,5 dias no processo imobilizado. Este fato comprova a boa adaptabilidade das bioesfera ao processo. O processo com leveduras livres finalizou com fermentação máxima de 76,62 % e mínima de 63,50 % e o processo com leveduras imobilizadas finalizou com fermentação máxima de 75,75 % e mínima de 62,66. Vale ressaltar que apesar do alto teor de lipídios contidos na farinha de pupunha a fermentação apresentou resultados satisfatórios em no percentual de fermentabilidade e

tempo total de fermentação. Os resultados obtidos entre máxima e mínima são próximos nos dois processos.

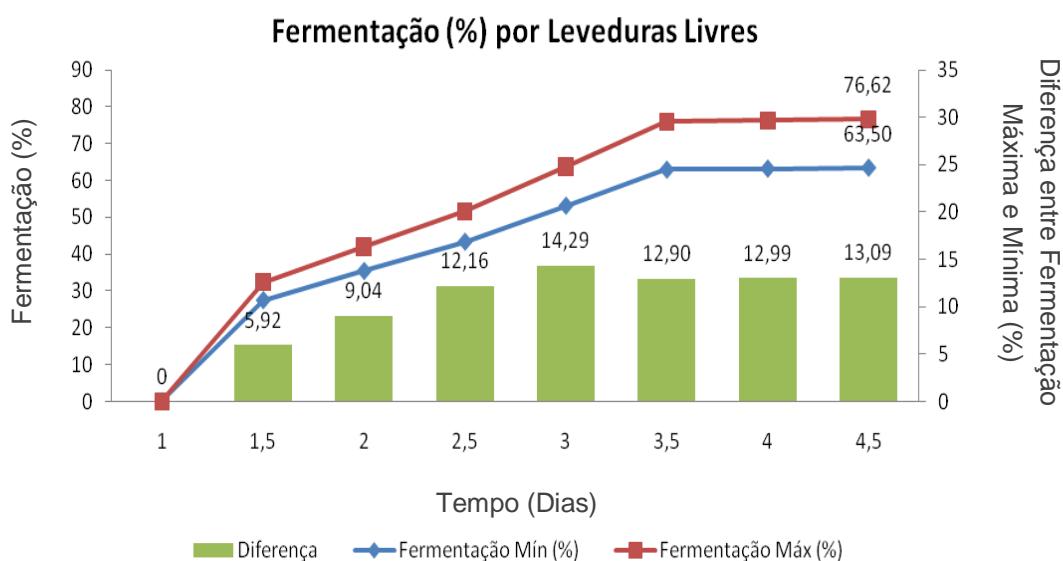


Gráfico 9. Percentual de fermentação do processo livre em função do tempo.

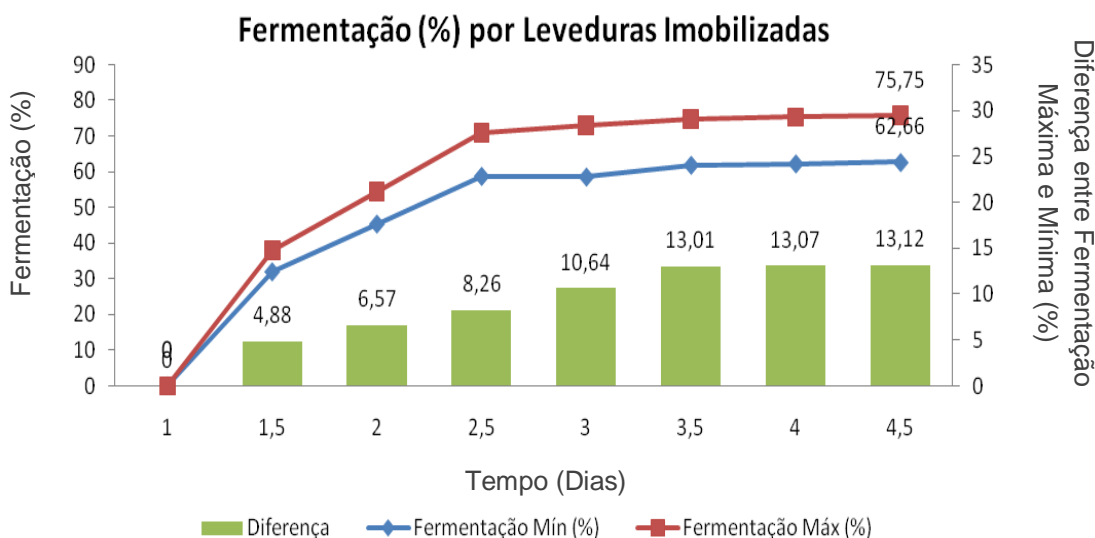


Gráfico 10. Percentual de fermentação do processo imobilizado em função do tempo.

Os valores relacionados a redução do extrato e produção de etanol em função do tempo com controle de temperatura estão apresentados na Gráfico 11 e 12. No processo fermentativo conduzido com leveduras livres observou-se o comportamento inversamente proporcional entre o extrato aparente e o teor de alcoólico da cerveja em fermentação. Após 3 dias de fermentação observou-

se uma maior estabilidade entre os compostos avaliados, com valores finais de etanol de 4,34 % (v/v) e extrato aparente de 2,77 °P.

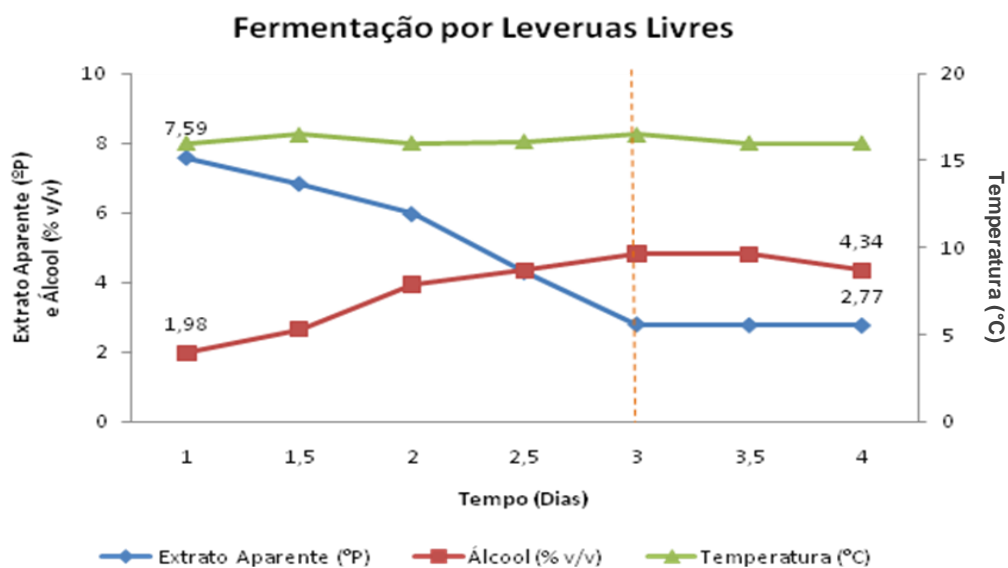


Gráfico 11. Variáveis do processo conduzido com leveduras livres relacionadas a temperatura, extrato aparente e álcool em função do tempo.

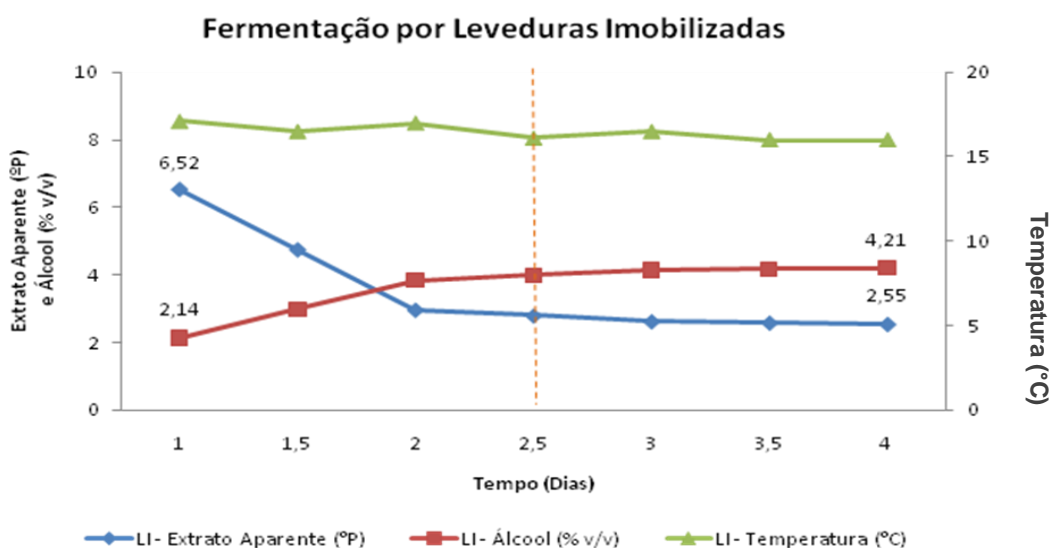


Gráfico 12.. Variáveis do processo conduzido com leveduras imobilizadas relacionadas a temperatura, extrato aparente e álcool em função do tempo.

No processo fermentativo inoculado com bioesferas, também observou-se o comportamento inversamente proporcional entre os valores de teor alcoólico e extrato aparente. No entanto, havia uma maior estabilidade dos

resultados a partir do segundo dia de fermentação. Este processo apresentou valores finais de etanol de 4,21 % (v/v) e extrato aparente de 2,55 °P. Em relação a temperatura os dois processos não apresentaram grandes variações.

Os processos para obtenção da cerveja finalizaram com quatro dias de fermentação. Os valores obtidos para o teor alcoólico de ambos os processos estão dentro dos padrões estabelecidos na legislação brasileira reportada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA (BRASIL, 2010) que determina para cervejas um teor alcoólico máximo de 8 % v/v. Quanto ao extrato aparente os valores podem variar de acordo com o tipo de bebida que se deseja obter, e pode ser corrigido no processo de mostura, pois quanto mais próximo de zero, menos “encorpada” é a cerveja.

Comparando os dois processos de fermentação, conduzidos com leveduras livres e imobilizadas, este último apresentou fermentação mais rápida, fato interessante em nível industrial.

6.6. VARIÁVEIS DE RESPOSTA AO BIOPROCESSO

As variáveis de resposta do bioprocessamento estão descritas na Tabela 5.. O processo com leveduras livres apresentou rendimento de células ($Y_{X/S}$) de 0,228 g.g⁻¹ e taxa específica de crescimento celular (μ_X) de 0,009.

Comparando os dois processos de obtenção das cervejas lager, quanto aos valores de rendimento ($Y_{P/S}$), produtividade volumétrica (Q_p) e eficiência fermentativa (E_f) observou-se que o processo fermentativo conduzido com células livres apresentou os melhores valores. Contudo, os valores obtidos, em se tratando de bebida, foram satisfatórios.

Segundo FAÇANHA (1998) a produtividade volumétrica (Q_p), o fator de rendimento de produção de etanol ($Y_{P/S}$) e a eficiência fermentativa (E_f) são os fatores de maior importância para o planejamento técnico da fermentação, pois evidenciam a velocidade de síntese do produto.

CARVALHO (2008) estudando elaboração de cerveja empregando banana como adjunto a 12°P, encontrou $Y_{P/S}$ de 0,45 g.g⁻¹, este valor foi próximo ao obtido no processo fermentativo com bioesferas.

Tabela 5. Variáveis de resposta dos bioprocessos de elaboração de cerveja utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzidas por leveduras livres e imobilizadas em alginato de cálcio.

Variáveis	Livre	Imobilizada
($Y_{X/S}$) Rendimento de Células em Relação ao Substrato (g.g^{-1})	0,228	Não realizado
(μ_X) Taxa Específica de Crescimento Celular (g.g^{-1})	0,009	Não realizado
(Q_p) Produtividade Volumétrica ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	0,050	0,044
($Y_{P/S}$) Rendimento de Produção de Etanol (g.g^{-1})	0,479	0,459
(EF) Eficiência Fermentativa (%)	93,74	89,84

6.7. QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICA DA CERVEJA

Os resultados físico-químicos da cerveja como produto final estão expressos na Tabela 6. Comparando os dois bioprocessos de obtenção da cerveja observou-se diferença estatística significativa ($p < 0,05$) para os resultados de extrato original, turvação em 24h a frio e teor alcoólico.

As cervejas elaboradas apresentaram extrato original de 11,83 °P e extrato aparente de 2,77 °P no bioprocessos conduzidos com células livres e extrato original de 11,72 °P e extrato aparente de 2,55 °P no bioprocessos conduzidos com leveduras imobilizadas. Os resultados obtidos são característicos de cerveja Pilsen.

A cor da cerveja oriunda de bioprocessos com leveduras livres foi de 8,87 EBC e na cerveja proveniente do bioprocessos com bioesferas foi de 8,32 EBC. De acordo com a legislação estabelecida pelo MAPA cervejas claras possuem cor abaixo de 20 EBC.

CURI et al. (2008) estudando cerveja com 60 % de maltose e 40 % de maltose de milho encontraram resultados semelhantes de cor, 8,5 EBC. Cabe mencionar que a coloração da cerveja é oriunda do tipo de matéria-prima utilizada em sua fabricação, o malte é o principal contribuinte. Outro fator que contribui interfere na coloração é o elevado tempo de fervura, acima de 120

minutos, pois o açúcar presente no mosto entra em processo de cristalização e quando combinados com aminoácidos escurecem o mosto.

Tabela 6. Composição físico-química das cervejas lager elaborada utilizando farinha de pupunha como adjunto conduzidas por processos fermentativos empregando levedura na forma livre e imobilizada em alginato de cálcio.

Físico-química	Livre	Imobilizada
Extrato Original (°P)	11,83 ^a ± 0,03	11,72 ^b ± 0,01
Extrato Aparente (°P)	2,77 ^a ± 0,12	2,55 ^a ± 0,17
Cor (EBC)	8,87 ^a ± 0,12	8,32 ^b ± 0,08
Amargor (EBC)	12,16 ^a ± 0,29	11,63 ^a ± 0,35
Gás Carbônico (% p/p)	0,52 ^a ± 0,04	0,51 ^a ± 0,05
pH	4,27 ^a ± 0,05	4,4 ^a ± 0,17
Turvação 24 horas (EBC)	1,20 ^a ± 0,06	0,75 ^b ± 0,09
Dicetonas (mg.L ⁻¹)	0,06 ^a ± 0,01	0,04 ^a ± 0,01
Teor Alcoólico (% v/v)	4,34 ^a ± 0,05	4,21 ^b ± 0,02

OBS: Resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras iguais na mesma linha não representam diferença estatística significativa ($p > 0,05$) entre as amostras estudadas, letras diferentes representam diferença estatística significativa. Unidade EBC, significa European Brewery Convention.

Quanto ao amargor às cervejas oriundas de bioprocessos com células livres apresentaram valores de 12,16 EBC e cervejas procedentes do bioprocessos com levedura imobilizada, 11,63 EBC. VENTURINI FILHO e CEREDA (1998) encontraram valores de amargor próximos, 10,8 e 11 EBC analisando cervejas com hidrolisado de milho e hidrolisado de mandioca, respectivamente; CURI et al. (2009) estudando cerveja puro malte encontraram resultados de amargor de 11,5 EBC.

A principal fonte de amargor para a cerveja é o lúpulo. Para uma mesma concentração de iso- α -ácidos o amargor pode ser diferente para cada bebida, dependendo da concentração dos isômeros *cis* e *trans*. Estes contribuem com proporções diferente para o amargor da cerveja e sua formação depende das

condições de isomerozação dos iso- α -ácidos, ocorrida durante a fermentação do mosto (TECHAKRIENGKRAIL *et al*, 2004)

O gás carbônico (CO₂) produzido durante a fermentação do extrato é suficiente para provocar a carbonatação da cerveja durante a maturação (CARVALHO *et al*, 2007). Ambas as cervejas elaboradas apresentaram em média 0,515 % de CO₂.

A cerveja obtida por bioprocessamento com leveduras livres apresentou pH de 4,27 e a oriunda de bioprocessamento com leveduras imobilizadas em alginato de cálcio foi de 4,4. Valores próximos foram encontrados por CURI *et al*. (2008) estudando cerveja de malte e maltose de milho (4,5 e 4,71pH).

A análise de turvação em 24 h na cerveja com leveduras livres ($1,20^a \pm 0,06$ EBC) apresentou resultado superior ao obtido para cerveja proveniente do processo com levedura imobilizada, com ($0,75^b \pm 0,09$ EBC). CURI *et al*. (2008) encontraram valores de 1,9 (EBC) em cerveja puro malte.

A turvação em cerveja esta relacionada principalmente a quantidade de células remanescente do processo após a retirada do fermento. A cerveja elaborada com leveduras imobilizadas apresentou baixo valor de turvação, isto deve-se ao fato das células estarem aprisionadas em uma matriz porosa de alginato de cálcio. Este fato evidencia também a boa estabilidade mecânica das bioesferas, que pode ser observada pelo baixo desprendimento celular durante o processo de fermentação. A cerveja elaborada com células imobilizadas apresentou valor de turvação 1,6 vezes menor quando comparado a turvação obtida em cerveja oriunda de processo com células livres.

Valores acima de 1 EBC podem ocasionar sedimentação de proteínas na cerveja. Este fato geralmente ocorre após 6 meses de armazenamento em prateleira, ou após sucessivas práticas de congelamento e descongelamento do produto.

A Figura 26 mostra o aspecto das cervejas oriundas de bioprocessos com células livres e imobilizadas, no início do processo de maturação após centrifugação de 25 mL das respectivas cervejas. Observando a figura fica evidente a maior quantidade de massa celular depreendida durante o bioprocessamento conduzido com células livres.

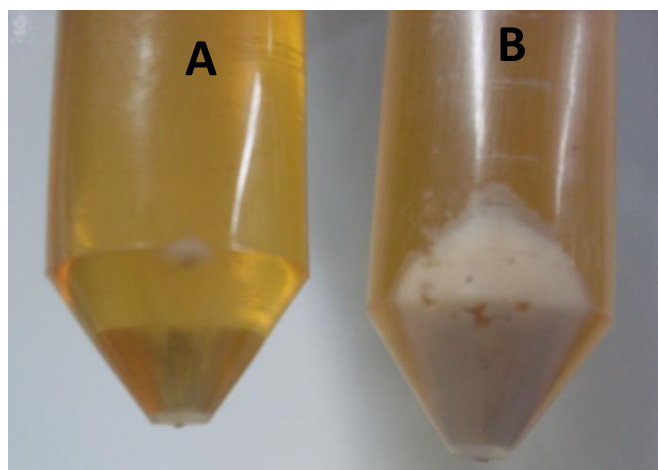


Figura 26. Resíduos de células após centrifugação das cervejas oriundas de bioprocessos com células livres (A) e imobilizadas (B). Amostra coletada no início do processo de maturação.

Os valores de dicetonas obtidos nas cervejas elaboradas foram na ordem de 0,06 e 0,04 mg.L⁻¹ para cerveja obtidas por bioprocessos com leveduras livres e imobilizadas, respectivamente. O limite de detecção sensorial do diacetil pelos consumidores é de 0,05 mg.L⁻¹ (LINKO et al., 1998)

O teor alcoólico das cervejas está relacionado com o tipo de mosto, com as temperaturas escolhidas para a fermentação e com as leveduras utilizadas no processo. As cervejas obtidas utilizando farinha de pupunha como adjunto apresentaram teor alcoólico entre 4,34 e 4,21 % v/v. Estes valores podem ser considerado como moderado quando comparado com o de outras bebidas alcoólicas fermentadas, como o vinho, por exemplo.

De acordo com o Decreto N°6871 de 04 de junho de 2009 que regulamenta a Lei N° 8.918 de 14 de julho de 1994 do MAPA (BRASIL, 2010) que define parametrização de cervejas, quando o extrato original da cerveja encontra-se entre 10,5 e 12 °P, a cerveja é classificada como “cerveja comum”, sendo as demais classificações ditas como: leve, quando apresentar extrato abaixo de 10,5 °P; extra, quando o extrato for entre 12 e 14 °P e, forte, quando os valores de extrato forem acima de 14 °P. De acordo com o acima exposto as cervejas obtidas podem ser classificadas como: cerveja tipo lager, clara, alcoólica e comum.

6.8. QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DAS CERVEJAS

A Tabela 7 contém os dados da qualidade microbiológica das cervejas obtidas após o processo de pasteurização. Após o processo de pasteurização as cervejas apresentaram-se isentas de microorganismos. Os resultados evidenciam a boa qualidade microbiológica das cervejas elaboradas, confirmando a eficiência do processo de pasteurização.

Tabela 7. Composição microbiológica após o processo de pasteurização das cervejas com adjunto de pupunha obtidas por leveduras livres e leveduras imobilizadas.

Análises Microbiológicas	Cervejas	
	Leveduras	
	Livres	Imobilizadas
Leveduras Selvagens (UFC.mL ⁻¹)	Ausente	Ausente
Bactérias Gram-Negativas (UFC mL ⁻¹)	Ausente	Ausente
Bactérias Lácteas (UFC mL ⁻¹)	Ausente	Ausente

UFC = Unidade formadora de colônias

6.9. AVALIAÇÃO SENSORIAL DAS BEBIDAS

No Gráfico 13 encontram-se a porcentagem das notas atribuídas pelos provadores para o teste de preferência entre as duas cervejas tipo lager elaboradas com adjunto de farinha de pupunha fermentadas por leveduras livres e imobilizadas.

Os resultados dos testes de preferência das cervejas tipo lager com adjunto de pupunha demonstram uma maior preferência pela cerveja oriunda do bioprocessamento conduzido com células livres (61,9 %) quando comparada com a cerveja obtida por bioprocessamento com leveduras imobilizadas.

Cabe ressaltar que as cervejas obtidas quando comparadas com o controle, cerveja tradicional puro malte, obtiveram menor preferência (Gráfico 14), no entanto os valores obtidos ainda foram satisfatórios uma vez que é um produto novo com características particulares da matéria-prima empregada como adjunto. A cerveja comum obteve preferência 1,46 vezes superior a

preferência obtida para cervejas elaboradas por bioprocessamento com células livres e 2,37 vezes superior a obtida para cerveja elaborada por bioprocessamento com bioesferas de alginato de cálcio.

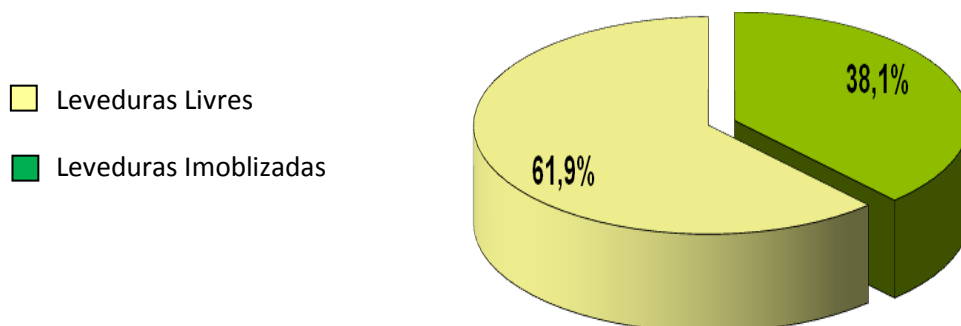


Gráfico 13. Preferência das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto conduzidas por bioprocessos com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio.

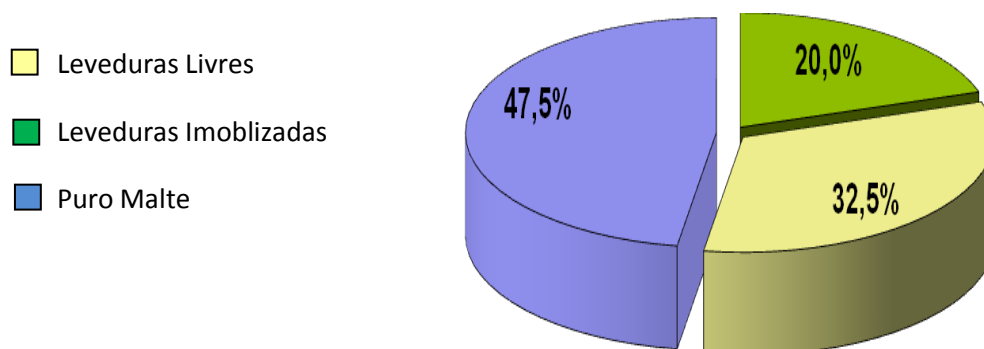


Gráfico 14. Resultados de preferência das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto conduzidas por bioprocessos com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio quando comparadas com uma cerveja tradicional puro malte.

Quanto a aceitabilidade das cervejas com farinha de pupunha os resultados obtidos foram satisfatórios (Tabela 8). Porém a cerveja de pupunha proveniente do bioprocessamento com células livres obteve maior porcentagem (78,61%) de aceitabilidade por parte dos provadores.

Tabela 8. Média das notas e frequências de respostas das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzidas por bioprocessos com células livres e imobilizadas em alginato de cálcio.

Cervejas	Valores			Aceitabilidade
	Média ± DP	<4	Valores >6	(%)
Adjunto pupunha/Levedura Livre	7,08 ± 1,59	3	32	78,61
Adjunto pupunha/Bioesferas	6,13 ± 1,86	10	24	68,06
Adjunto Malte (Controle)	7,45 ± 1,4	0	35	-

A Figura 27 mostra o aspecto visual das cervejas lager com adjunto de farinha de pupunha, elaboradas com leveduras livres e imobilizadas.



Figura 27. Aspecto das cervejas elaboradas utilizando farinha de pupunha como adjunto, conduzidas por bioprocessos com células livres (A) e imobilizadas em alginato de cálcio (B).

7. CONCLUSÃO

A farinha de pupunha constitui-se em uma interessante fonte de adjunto para a elaboração de cerveja em função de sua característica amilácea, sabor e aroma agradáveis e fácil processamento.

O teor de lipídios presente na farinha de pupunha não interferiu no processo fermentativo e nas características finais das bebidas. As bioesferas apresentam estabilidade química e mecânica durante o bioprocessamento de elaboração da cerveja.

O emprego de bioesferas no bioprocessamento de elaboração da cerveja ofereceu maior facilidade de filtração no processo de obtenção da cerveja bem como contribuiu para maior rendimento em bebida.

O uso de farinha de pupunha como adjunto gera cervejas de boa qualidade com excelentes características de cor, amargor, evidenciando a boa condução do bioprocessamento.

As cervejas com farinha de pupunha, oriundas de bioprocessamento com leveduras livres obtiveram maior preferência e aceitabilidade.

Os dados das análises estatísticas demonstraram a melhor qualidade da cerveja elaborada com leveduras livres diante dos resultados de extrato original, aparente, cor, turvação e teor alcoólico.

Os resultados das variáveis de resposta mostraram melhor desempenho das leveduras na forma livre no bioprocesso, diante dos fatores de $Y_{P/S}$, QP e EF.

O uso de leveduras imobilizadas influenciou positivamente na velocidade de condução do processo.

As cervejas obtidas com farinha de pupunha apresentaram boas características organolépticas, aparência e aceitabilidade sensorial.

8. SUGESTÕES

O estudo realizado abriu um leque de informações que possibilitam novas pesquisas no que se refere ao emprego de farinha de pupunha como fonte secundária de carboidratos fermentescíveis para elaboração de bebidas como a cerveja, bem como a possibilidade do emprego de outros frutos amazônicos com a mesma finalidade.

Ressalta-se ainda a possibilidade de fabricação de farinha de pupunha com casca, que também poderá exercer função filtrante no processo de mostura para elaboração de cervejas, além de aumentar o rendimento do fruto em farinha.

Empregar novas formas de condução do bioprocessamento, como exemplo, por batelada alimentada e contínua, visando aumentar a produtividade do bioprocessamento para elaboração da cerveja utilizando farinha de pupunha como adjunto

Investigar de forma mais detalhada o desempenho dos agentes fermentativos no bioprocessamento.

Investigar por meio de análises cromatológicas a formação de metabólitos secundários durante o processo de fermentação, de cada

bioprocesso empregado, para elaboração da cerveja utilizando farinha de pupunha como adjunto.

Realizar estudo econômico do desenvolvimento de cerveja utilizando farinha de pupunha como adjunto para cada condução de bioprocessos, por leveduras livres e por leveduras imobilizadas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE. C.M. *Obtenção de chope utilizando arroz preto (Oryza sativa) como adjunto de malte*. Lorena, 2007. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial – Faculdade de Engenharia Química de Lorena EEL/USP).

ALMEIDA E SILVA, J.B. “Cerveja”. In: VENTURINI FILHO, W.G. (Org.) *Tecnologia de Bebidas*. Ed. Edgar Blücher, São Paulo, v.1, 2005. p. 347-380.

ALMEIDA, R.B. *Avaliação dos Fatores que Influenciam na Concentração de Dicetonas Vicinais na Cerveja Produzida pelo Processo de Alta Densidade com Utilização de Planejamento de Experimentos*. Lorena, 1999. 96p. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia Industrial – Faculdade de Engenharia Química de Lorena EEL/USP).

ALVES, S.B. MORAES, S.A. “Quantificação do inóculo de patógenos de insetos”. In: ALVES, B.S. *Controle Microbiano de Insetos*. 2º ed. Piracicaba: Ed. FEALQ, 1998. p. 765-777.

AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. (Ed.). *Biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001, 523 p.

BRÁNYIK, T.; SILVA, D.P.; VICENTE, A.A.; LEHNERT, R.; ALMEIDA E SILVA, J.B.; DOSTALEK, P.; TEIXEIRA, J.A.C. Continuous immobilized yeast reactor system for complete beer fermentation using spent grains and corncobs as carrier materials. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Alemanha, v. 33, p.1010-1018, 2006.

BRASIL. *Decreto n. 2314, de 4 de setembro de 1997*, que regulamenta a Lei nº 8.918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Seção I.Art. 64. Brasília. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. 2007. (30/01/2010). <http://www.agricultura.gov.br>.

BOHORQUEZ, R.N.; YCAZA, H.C. Estudio experimental del aprovechamiento del fruto del pejibaye (*Guilielma gasipaes*). *Ver*, Universidad de Guayaquil, v. 72, n. 2, p. 103-113,1988.

BUSHELL, M.E. *Progress in industrial microbiology*. Oxford: Elsevier, 1984. 198p.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Biocalizadores immobilizados: uso de células e enzimas immobilizadas em processos biotecnológicos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, Ano IX, n. 36, 2006.

CARVALHO, G.B.M.; DRAGONE, G.; BENTO, C.V.; SANTOS, D.T.; SARROUH, B.F.; FELIPE, M.G.A.; ALMEIDA e SILVA, J.B. Utilização da banana como adjunto na obtenção de mosto cervejeiro de alta densidade: um estudo para fi biotecnológico clássico inédito. In: Congresso Mineiro de Propriedade Intelectual. Juiz de Fora/MG, 9-11 de ago, UFJF/MG, 2006.

CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro. 1º parte: As Leveduras. *Revista Analítica*, n.25, p. 36-42, 2006.

CARVALHO, G.B.M.; ROSSI, A.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro. 2º parte: A Fermentação.

Revista Analítica, n.26, p. 46-54, 2007.

CAVALCANTE, B.P. *Frutas comestíveis da Amazônia*. 5ª ed. Manaus: Ed. Cejup. 1991. p.196-199.

CEREDA, M.P. “Cervejas”. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. *Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação*. São Paulo: Edgar Blucher, 1983, p.3-78.

CLEMENT, C.R.; MORA-URPI, J.E. Pejibaye Palm (*Bactris gasipaes* H.B.K. Aracaceae): Multi-use potencial for the lowland Humid Tropics. *Jorn. Econ. Bot.*, v. 42, n. 2, p. 302-311, 1987.

COVIZZI, L.G.; GIESE, E.C.; GOMES, E.; DEKKER, R.F.H.; SILVA, R. Imobilização de células microbianas e suas aplicações biotecnológicas. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, Londrina, v. 28, n. 2, 2007, p. 143-160.

CURI, R.A.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C.; NOJIMOTO, T. Produção de cerveja utilizando cevada e maltose de milho como adjunto de malte: análises físico-química, sensorial e isotópica. *Braz. Journal Food Technology*, v.11, n.4, p.279-287, 2008.

DE ANGELIS, R. C. *Fisiologia da nutrição: fundamentos para nutrição e desnutrição*. São Paulo: EDART, v. 1, 1977, p. 43-53.

DIAS, D. R.; PANTOJA, L.; SCHWAN, R.F. “Fermentados de Frutas”. In: VENTURINI FILHO, W. G. *Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia*. São Paulo: Blucher. v. 1. 2010. p. 85-111.

DRAGONE, G.; MUSSATO, S.I.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Inovações na produção de cerveja: fermentação contínua utilizando leveduras imobilizadas em suporte natural obtido a partir do bagaço de malte. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 35, 2007.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J.B.. “Cerveja”. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.). *Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia*. São Paulo: Blucher, v. 1, 2010, p. 15-50.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION - EBC. *Analytica – EBC*, 4° ed, Zurich: Brauerei, 1987, 271 p.

FAÇANHA, S.H.F. Estudo dos parâmetros cinéticos básicos da fermentação alcoólica do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) clarificado. Fortaleza, 1998. 119p. (Dissertação de Mestrado em Biotecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Ceará).

FICAGNA, E. *Influência do tempo de maceração na composição química do fermentado e do destilado de pêsego (*Prunus persica* L. Batsch), Cv. Chiripá*. Florianópolis, 2005. (Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos - Universidade Federal de Santa Catarina).

FERREIRA, C.D.; PENA, R.S. Comportamento hidrocópico da farinha de pupunha (*Bactris gasipaes*). *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v.23, n.2, p. 251-255, 2003.

FURTADO, G.F.; PORTO, A.G.; SILVA, F.S.; SANTOS, P. Avaliação físico-química da polpa de manga (*Mangifera indica* L. var. *Espada*). In: *Anais do 2º Jornada Científica da Unemat*. ago. 2009. Universidade do Estado do Mato Grosso. Mato Grosso: Unemat, 2009. p.56-63.

HARDWICK, W.A. *Handbook Brewing*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1994, 533p.

HARGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. “Amilase Fúngica”. In: *Bioquímica das Fermentações*, 1982. 56 p.

HOUGH, J. S. *Biotecnología de la cerveza y de la malta*. Espanha: Acribia, 1996. 194p.

Instituto Adolfo Lutz - IAL. *Métodos físico-químicos para análises de alimentos*. 4º Ed. São Paulo: IAL, 2008, 1020p.

KUNZE, W. *Technology Brewing and Malting*. International Edition. Im Verlag Der. Ed. VLB Berlin: Alemanha, 2009, 722p.

LEONEL, M.; JACKEY, S.; CEREDA, M.P. Processamento industrial de fécula de mandioca e batata doce: Um estudo de caso. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 18, n. 3, p. 343-345, 1998.

LINKO, M; HAIKARA, A; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, v. 65, p.85-98, 1998. .

MCCREADY, R.M.; GUGGOLZ, J.M.; SILVEIRA, V.; OWENS, H.S. Determination of starch and amylose in vegetables. Application to pear. *Analytical Chemistry*, Flórida, v. 22, 1950, p. 1156-1158.

MELNIKOV, G.M.D. *Fermentação primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte*. Lorena, 2007. 140p. (Tese de Doutorado em Biotecnologia Industrial – Faculdade de Engenharia Química de Lorena EEL/USP).

MONTEIRO, C. L. B. *Técnicas de avaliação sensorial*. 2ª. ed. Curitiba: CEPPA, 1984.

MORA-URPI, J. (05/03/2009) Peach-palm (*Bactris gasipaes*). <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/1492/peach-palm.html>.

MUNROE, J.H. "Fermentation". In: HARDWICK, W.A. (Org.). *Handbook of Brewing*. New York: Marcil Dekker, 1994a, p. 323-362.

MUNROE, J.H. "Aging and Finishing". In: HARDWICK, W.A. (Org.). *Handbook of Brewing*. New York: Marcil Dekker, 1994b, p. 355-379.

OLIVEIRA, M.E.S. *Elaboração de bebida alcoólica fermentada de cagaita (Eugenia dysenterica DC) empregando leveduras livres e imobilizadas*. Lavras, 2010. 75p. (Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola – Universidade Federal de Lavras).

PANTOJA, L. *Processo fermentativo para produção de bebida alcoólica de pupunha (Bactris gasipaes Kunth)*. Manaus, 2000. 136p. (Dissertação de Mestrado em Ciência de Alimentos - Universidade do Amazonas).

PANTOJA, L.; MAEDA, R.N.; ANDRADE, J.S.; PEREIRA JUNIOR, N.; CARVALHO, S.M.S.; ASTOLF-FILHO., S. Processo fermentativo para produção de bebida alcoólica de pupunha (Bactris gasipaes Kunth). *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. Brasília, v. 3, n.19, p.50-54, 2001.

PANTOJA, L.; PEREIRA JR, N.; YUYAMA, L.K. *Seleção e Aproveitamento Biotecnológico de Frutos da Amazônia para Elaboração de Bebida Alcoólica Fermentada Utilizando Levedura Imobilizada*. Manaus, 2006. 176p. (Tese de Doutorado em Biotecnologia - Universidade Federal do Amazonas).

PANTOJA, L.; NEVES, N.A.; DESSIMONI, N.A.V.; SANTOS, A.S. Produção e caracterização química da bebida alcoólica fermentada de jabuticaba obtida por processo conduzido com leveduras imobilizadas. In: Anais do XVII Simpósio Nacional de Bioprocessos.02-05 de ago. 2009. Natal/RN. 2009. 6p.

REINOLD, M.R. *Produtos utilizados para melhorar a estabilidade físico-química da cerveja: Engarrafador Moderno*. São Paulo, n.52, 1997. p. 56.

SACHS, L.G. *Cerveja*. Bandeirantes: Fundação Faculdades Luiz Meneghel, 2001, 26p.

SENAI. *Conheça a cerveja*. Rio de Janeiro: Setor de referência Bibliográfica do CENATEC de produtos alimentares do SENAI – DR/RJ, Vassouras, 1997.

SIEBERT, K.J. Effects of protein-polyphenol interactions of beverages haze, stabilization, and analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n.

2, 1999, p.353-362.

SILVA, D.P. *Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares inicial*. Lorena, 2005. 177p. (Tese de Doutorado em Biotecnologia Industrial - Faculdade de Engenharia Química de Lorena EEL/USP)

SILVA, D.P.; BRÁNYIK, T.; DRAGONE, G.; VICENTE, A.A.; TEIXEIRA, J.A.C.; ALMEIDA E SILVA, J.B. High gravity batch and continuous processes for beer production: Evaluation of fermentation performance and beer quality. *Chemical Papers*, v. 62, p. 34-41, 2008.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos*. São Paulo: Livraria Varela, 1997, 295p.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 16, n. 3, 1965, p. 144-158,

SOARES, T. J. Tem pupunha na Amazônia. Brasil. *Revista Brasil Agrícola*. p. 15-17, 1986.

SOUTHGATE, D.A.T. *Determinacin of food carbohydrates*. Cambridge: Elsevier Science Publishers. Cambridge, 1991, 232p.

STEWART, G.G. "Adjunts". In: HARDWICK, W.A. (Org.). *Handbook of Brewing*. New York: Marcil Dekker, 1994, p. 121-132.

STREMEL, D.P. *Engenharia Bioquímica: Núcleo orientado*. Tubarão, 2008. 58p.

TECHAKRIENKRAIL, I. Relationships of sensory bitterness in *lager* beer to iso-alfa-acid contents. *Journal of the Institut of Brewing*, v. 110, n. 1, p. 51-56, 2004.

TSCHOPE, E.C. Microcervejarias e Cervejarias: A História, a Arte e a Tecnologia. São Paulo: Editora Aden, 2001, 223p.

VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J.P. *Bebidas: tecnología, química y microbiología*. Zaragoza: Ed. Acribia, v. 2, 1997, p. 289-294.

VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Hidrolisado de fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja: avaliação química e sensorial. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, v. 18, n. 2, 1998.

VENTURINI FILHO, W.G. "Qualidade da cerveja". In: _____ *Tecnologia de cerveja*. Jaboticabal: Funep, 2000. p. 58-68.

VENTURINI FILHO, W.G., CEREDA, M.P. "Cerveja". In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial. Biotecnologia na Produção de Alimentos*. São Paulo: Edgar Blücher, v. 4, 2001, p.91-144.

YUYAMA, L.K.O.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J.P.L; SOUSA, R.F.S. Biodisponibilidade de vitamina A da pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) em ratos. Notas e Comunicações. *Acta Amazônica*, v. 29, n. 3, 1999, p. 497-500.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. Research on antioxidant activity of flavonoids from natural materials. *Food Chem*. v. 64, 1999, p. 555-559.