



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ALEXANDRE MONTAGNANA VICENTE LEME

**EFEITO DE DIFERENTES LEVEDURAS E CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO NO
AMARGOR DA CERVEJA**

CAMPINAS – S.P.

2017

ALEXANDRE MONTAGNANA VICENTE LEME

**EFEITO DE DIFERENTES LEVEDURAS E CONCENTRAÇÕES DE INÓCULO NO
AMARGOR DA CERVEJA**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de
Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Flavio Luís Schmidt

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO ALEXANDRE MONTAGNANA VICENTE
LEME, E ORIENTADA PELO PROF. DR. FLAVIO
LUIS SCHMIDT

CAMPINAS

2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

L542e Leme, Alexandre Montagnana Vicente, 1986-
Efeito de diferentes leveduras e concentrações de inóculo no amargor da
cerveja / Alexandre Montagnana Vicente Leme. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Flávio Luís Schmidt.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Engenharia de Alimentos.

1. Bebidas. 2. Leveduras. 3. Sabor. 4. Produção. 5. Fermentação. I.
Schmidt, Flávio Luís. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Effect of different yeast strains and pitching rates in beer bitterness units

Palavras-chave em inglês:

Beverages

Yeast

Flavor

Production

Fermentation

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Flávio Luís Schmidt [Orientador]

Juliano Lemos Bicas

Maria Fernanda Demonte Penteado Moretzsohn de Castro

Data de defesa: 29-11-2017

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt
Orientador
Universidade Estadual de Campinas – FEA

Prof. Dr. Juliano Lemos Bicas
Membro Titular
Universidade Estadual de Campinas – FEA

Dra. Maria Fernanda Demonte Penteado Moretzsohn de Castro
Membro Titular
Instituto Agrônômico de Campinas – IAC

A ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

À minha esposa e aos meus pais,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos meus pais, Sonia e Afonso. Sem eles nada disto seria possível.

À minha esposa Kazumi, pelo companheirismo e suporte em todos os momentos.

Ao Prof. Flávio Luis Schimdt, pela oportunidade, ensinamentos e amizade.

À Ana Koon pela amizade e pelos ensinamentos.

Aos amigos do laboratório Sebastian, Diana, Miguel, Mária e Juliana.

À Priscila por toda a dedicação ao trabalho.

Aos amigos de Pesquisa e Desenvolvimento da Heineken Brasil, Rubens Mattos, Edilson Tonon, Paulo André e Thaís Sivi pelas conversas, sugestões e ajuda.

À Diana Lima e Neli da Liotécnica.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram com este trabalho.

RESUMO

A indústria cervejeira apresenta grande expressão mundialmente, sendo a cerveja uma bebida amplamente consumida e difundida. A determinação correta da medida de amargor da cerveja é fundamental para garantia do controle de qualidade na produção desta classe de bebidas. Atualmente a medida de BU (*Bitterness Unit*) é a adotada para prever o amargor da cerveja. Nosso objetivo neste projeto foi avaliar a alteração na medida de amargor (BU) com a utilização de diferentes linhagens de levedura e alteração da concentração de inóculo no processo de fermentação da cerveja (10^7 ; 10^6 e 10^5 cél./mL^{°P}). Foi utilizado mosto padrão a 11,8°P e 82,1 BU e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis – Safale US-05, Fermentis – Safale US-04 e Mangrove-M44 US West Coast). Para análise de BU foi aplicado o método definido pela ASBC (*American Society Brewing Chemists*) e EBC (*European Brewery Convention*). Foram avaliados ao longo da fermentação e após a maturação os seguintes parâmetros: número de células vivas em suspensão, pH, teor alcoólico (v/v), extrato real e taxa de atenuação. Diante dos dados obtidos foi possível observar uma maior perda dos compostos de amargor para as amostras com a levedura Fermentis-Safale-US-05 a 10^7 cél./mL^{°P} tanto após fermentação (54,8%) como também, após a maturação (70%). Já para a levedura Fermentis US-04 foi possível verificar diferença ao término da fermentação entre as amostras inoculadas a 10^7 e 10^6 cél./mL^{°P} (49,4% e 39,6% de perda respectivamente). Após a maturação não houve diferença significativa entre as amostras inoculadas com esta cepa (perda em torno de 54%). Já para a levedura Mangrove-M44 houve perda na medida de amargor após a etapa de fermentação, entre 39 e 50%, e de maturação, entre 53 e 63%. Todas as amostras mostraram perfis semelhantes de perda de BU, sendo que a principal perda ocorreu nos primeiros dias de fermentação, no momento em que há um pico de multiplicação de células. Durante a maturação todas as amostras obtiveram perdas significativas dos compostos de amargor, indicando uma associação destes compostos a leveduras e a maiores perdas para as fermentações de maior intensidade (com maiores concentrações de inóculo).

Palavras chave: bebidas, leveduras, sabor, produção, fermentação.

ABSTRACT

The brewing industry has a worldwide presence, with beer being widely consumed and widespread. The correct determination of the bitterness of beer is fundamental to guarantee quality control in the production of this class of beverages. Currently the measure of BU (Bitterness Unit) is the one adopted to predict the bitterness of beer. Our objective in this project was to evaluate the alteration in bitterness (BU) with the use of different strains of yeast and alteration of pitching rate in the beer fermentation process (10^7 , 10^6 and 10^5 cells / mL). Standard wort at 11.9 ° P and 82.1 BU and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts (Fermentis-Safale US-05, Fermentis-Safale US-04 and Mangrove-M44 US West Coast) were used. For the analysis of BU, the method defined by the American Society Brewing Chemists (ASBC) and EBC (European Brewery Convention) was applied. The following parameters were evaluated during fermentation and after maturation: number of cells in suspension, pH, alcohol content (v / v), real extract and attenuation rate. In view of the obtained data, it was possible to observe a greater loss of bitterness for the samples with the Fermentis-Safale-US-05 yeast at 10^7 cells / mL. °P after both fermentation (54.8%) and maturation (70 %). For Fermentis yeast US-04, it was possible to verify the difference at the end of the fermentation between the samples inoculated at 10^7 and 10^6 cells / mL (49.4% and 39.6%, respectively). After maturation there was no significant difference between the samples (loss around 54%). For Mangrove-M44 yeast, there was loss of bitterness after fermentation (between 39 and 50%) and maturation (between 53 and 63%). All of the samples showed similar profiles of BU loss, and the main loss occurred during the first days of fermentation, at a time when there was a peak of cell multiplication. During maturation, all samples obtained significant loss of bitterness compounds. An association of these compounds with yeasts and higher losses for higher intensity fermentations (with higher concentrations of inoculum) is indicated.

Keywords: beverage, yeast, flavor, production, fermentation

Sumário

1. Introdução.....	11
2. Objetivo.....	12
2.1 Objetivo geral	12
2.2 Objetivos específicos	13
3. Revisão Bibliográfica.....	13
3.1 Mercado de cervejas	13
3.2 Produção de cerveja.....	16
3.2.1 Água	16
3.2.2 Lúpulo.....	17
3.2.3 Malte	17
3.2.4 Leveduras cervejeiras	18
3.3 Etapas da produção da cerveja	18
3.3.2 Brassagem.....	20
3.3.3 Fermentação	21
3.3.4 Maturação.....	22
3.3.5 Envase	22
3.4 Lúpulo e os Iso- α -ácidos.....	23
3.5 Perda de amargor (iso- α -ácidos) durante os processos	26
4. Materiais e Métodos	29
4.1 Micro-organismos	30
4.2 Fabricação do Mosto.....	30
4.3 Fermentação	31
4.4 Análises.....	33
4.4.1 Medida de Amargor - Bitterness Units (BU).....	33
4.4.2 Contagem de células.....	34
4.4.3 Análises físico-químicas	35
4.5 Análise estatística.....	36
5. Resultados e Discussão	36
5.1 Variação de Unidades de Amargor ao longo da fermentação e maturação.....	36
5.2 Variação da contagem de células ao longo da fermentação e maturação.....	43
5.3 Variação do pH ao longo da fermentação e maturação	49
5.4 Variação do teor de álcool ao longo da fermentação e maturação	51
5.5 Variação do Extrato Real ($^{\circ}$ P) ao longo da fermentação e maturação.....	55

5.6	Varição da taxa de atenuação ao longo da fermentação e maturação.....	59
5.7	Comparação dos resultados obtidos com equações de predição de BU	63
6.	Conclusões.....	64
7.	Sugestão para trabalhos futuros	66
8.	Referências	67

1. Introdução

A cerveja é uma das bebidas mais apreciadas e disseminadas no mundo, possuindo sabor e aroma característicos, devido a diversos compostos que são formados nas diferentes etapas de seu processamento. Sua disseminação, entre outros fatores, pode ser relacionada à viabilidade de produção em larga escala (PIRES *et al.*, 2014, GRASSI *et al.*, 2014), sendo que a produção mundial de cerveja aumentou de 630 para 1846 milhões de hectolitros nas últimas quatro décadas (BARTH-HAAS GROUP, 1971; BARTH-HAAS GROUP, 2013)

O maior consumo mundial ainda é referente às cervejas estilo *Pilsen*, produzidas em larga escala pelas grandes indústrias. No entanto, nos últimos anos tem-se observado um crescimento na disponibilidade de uma maior variedade de estilos e tipos de cervejas no mercado nacional e internacional, produzidas por cervejarias artesanais (ISTOÉ, 2013).

O amargor é um atributo muito importante e relevante na avaliação do consumidor de cerveja. Sensorialmente, é um dos atributos de mais fácil distinção (HUGHES, 2000) e, além disso, contribui para um paladar mais equilibrado da bebida (MALOWICKI; SHELLHAMMER, 2005). Sua intensidade varia dentre os diversos estilos de cervejas existentes como, por exemplo, o estilo *American India Pale Ale* que possui amargor característico e intenso, diferindo do estilo *American Light Lager*, que apresenta amargor mais suave (PAPAZIAN, 2006).

O sabor e aroma distintos da cerveja são as principais razões para se adicionar o lúpulo à cerveja, conforme relatado por Moritz e Morris, 1981. Estes autores ainda citam mais quatro motivos para a inclusão do lúpulo na receita da cerveja:

- Para precipitar determinados compostos nitrogenados do mosto;
- Para ser um agente filtrante na clarificação do mosto;
- Para atribuir efeito bactericida à cerveja;
- Para auxiliar na esterilização do mosto;

Hughes e Simpson (1993) incluem também a melhoria do desempenho e estabilidade da espuma.

Os compostos aos quais é atribuído o amargor da cerveja são os iso- α -ácidos (MEILGAARD, 1960). São produtos da isomerização dos α -ácidos, que ocorre (compostos presentes no lúpulo) durante a fervura e clarificação do mosto. Os iso- α -ácidos são solúveis e misturam-se na composição da cerveja atribuindo assim o amargor. Esses produtos da isomerização são os principais responsáveis pelo amargor da cerveja (ALMAGUER, 2014).

O amargor poderá ser maior ou menor dependendo das diferentes formulações e processos de produção. As diferentes etapas da cerveja podem ter relação com sua perda ou aumento, como a fervura (LIU et al., 2009), maturação com *dry-hopping*, (uma técnica que consiste na adição de lúpulo ao final da maturação) (PARKIN, 2014) e fermentação (LAWS, et. al, 1972).

Para quantificar o amargor da cerveja tanto a ASBC (*American Society of Brewing Chemists*) quanto a EBC (*European Brewery Convention*) utilizam como padrão a medida de BU (*Bitterness Units*). Esta foi uma maneira encontrada para quantificar numericamente o amargor da cerveja por espectrofotometria (HOWARD, 1968).

Existem outros fatores que podem influenciar no amargor, como o tipo de levedura usada (HOUGH, 1961) e o método de fermentação. (LAWS, 1972).

Durante o processo de fermentação, uma pequena parte das perdas do amargor é resultante da absorção feita pelas paredes celulares das leveduras. E também por efeitos de superfície, nos quais as substâncias de amargor são carregadas para a superfície pelas bolhas de dióxido de carbono, resultando em uma concentração considerável destes compostos na espuma formada (LAWS, 1972).

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a influência da aplicação de diferentes cepas de leveduras e concentrações de inóculo no amargor da cerveja, em termos de unidades de amargor (BU).

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Avaliar as unidades de amargor (BU) ao longo da etapa de fermentação, utilizando diferentes cepas de levedura.
- Avaliar as unidades de amargor (BU) após a etapa de maturação da cerveja
- Relacionar a variação nas unidades de amargor (BU) da cerveja com outros parâmetros como contagem de células, pH, teor alcoólico, extrato real e teor de atenuação.

3. Revisão Bibliográfica

3.1 Mercado de cervejas

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, representando 78,2% do consumo de bebidas alcoólicas. Em alguns países seu consumo pode ser ainda maior, como, por exemplo, no México, onde representa 93,3% do consumo de bebidas alcoólicas (EUROMONITOR, 2014 apud GÓMEZ-CORONA et al., 2016). O consumo de cerveja nos Estados Unidos está próximo a 231 milhões de hectolitros por ano (REID et al, 2014). Somente nas últimas quatro décadas (1970 – 2010), o volume mundial de produção triplicou de 630 para 1.846 milhões de hectolitros (BARTH-HAAS GROUP, 1971; BARTH-HAAS GROUP, 2013). Já no Brasil, entre 2010 e 2014, a produção, segundo dados do Sicobe (Sistema de Controle de Produção de Bebidas, 2015), aumentou 10%, atingindo em 2014 um volume de 141 milhões de hectolitros. No entanto em relação ao consumo per capita o Brasil ocupa a 26ª posição com 67,7 litros por ano. Na primeira posição está a República Checa com o consumo per capita de 142,4 litros/ano (KIRIN HOLDINGS, 2016).

Nos dois últimos anos o Brasil apresentou quedas consecutivas no volume de produção, atingindo em 2016 133 milhões de hectolitros (redução de 5,7% frente 2014). Em termos de produção mundial, o Brasil ocupa a terceira colocação, ficando

atrás apenas da China (460 milhões de hectolitros) e Estados Unidos da América (221 milhões de hectolitros) (BARTH-HAAS GROUP, 2016), demonstrando a importância mundial do mercado brasileiro de cervejas.

É possível observar uma tendência mundial de valorização e crescimento do mercado de cervejas artesanais. A ideia do chamado movimento de “cultura cervejeira” é trazer cervejas cujo processo de produção, incluindo as matérias-primas utilizadas, preze pela qualidade do produto (GIORGI, 2015, ELZINGA et al., 2015). Observa-se um aumento no número de estabelecimentos relacionados a este segmento, a disseminação de eventos de cerveja artesanal, cursos de degustação e harmonização, cursos de *beer somelier*, cursos de produção de cerveja caseira, entre outros (GIORGI, 2015).

Um estudo sobre consumo de cervejas artesanais na Itália revelou que fatores que atraem o consumidor para a aquisição de cervejas artesanais podem estar relacionados a aromas maltados, de mel e amendoados, geralmente não encontrados nas cervejas convencionais. O estudo ainda revelou que a ocasião de consumo de cervejas artesanais ocorre em bares ou com a família (AQUILANI et al., 2015). Ainda, um estudo sobre cervejas artesanais no México, revelou que alguns fatores são importantes no consumo, tais como a busca por conhecimento, a possibilidade de experimentar novos sabores e ter uma alternativa às cervejas tradicionais. Além disso, o mesmo estudo revelou que o conceito de artesanal ainda pode gerar um pouco de confusão, não estando completamente definido, visto que alguns consumidores ainda classificam como artesanais cervejas que são “industriais” (GÓMEZ-CORONA et al., 2016). REID et al. (2014) ressaltam dois fatores relacionados ao crescimento das cervejarias artesanais: os consumidores começam a buscar produtos e serviços ligados à comunidade local e a insatisfação dos consumidores com a cerveja comum, buscando cervejas mais saborosas e mais fortes.

A exemplo do que também vem acontecendo em outros países, é possível observar no Brasil um aumento das cervejas e cervejarias artesanais, havendo uma diferenciação por parte do consumidor do produto artesanal daquele massificado produzido em larga escala (GIORGI, 2015). No entanto, o consumo de cervejas artesanais no Brasil ainda é restrito a certa parte da população.

Esta evolução é documentada por diversos meios de comunicação, dos quais podemos citar a reportagem do portal de notícias ISTOÉ, 2013, que relata a expectativa de crescimento do mercado de cervejas artesanais de 0,15% para 2% em até uma década (ISTOÉ, 2013). Além disso, de acordo com ANTUNES, 2015, o valor em vendas no segmento de cerveja artesanal no Brasil em 2014 foi de 700 milhões de dólares.

Este movimento de crescimento das cervejarias artesanais não ocorre apenas no Brasil. Nos Estados Unidos, a cerveja artesanal se desenvolveu a partir da década de 1970 (HINDY, 2014 apud GOIA e CHAVES, 2016). Ao longo dos anos, houve uma diminuição no número de grandes cervejarias e um crescimento no número de cervejarias artesanais nos EUA, conforme pode ser observado na Figura 1, que apresenta dados de 1947 a 2013.

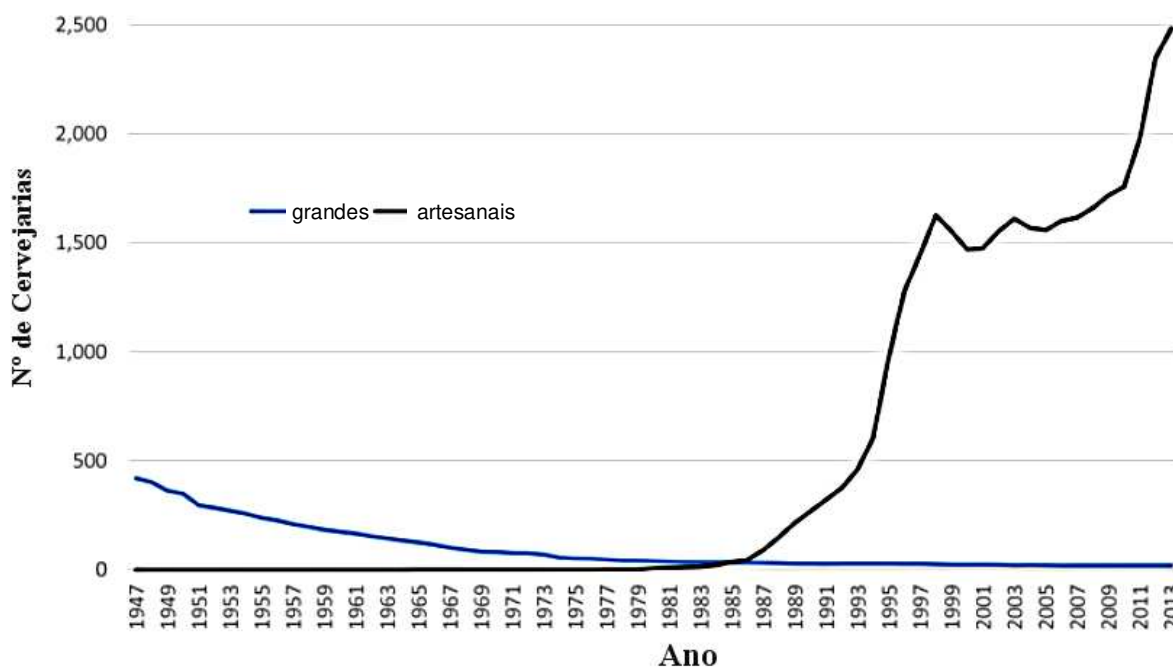


Figura 1. Número de grandes cervejarias e cervejarias artesanais nos Estados Unidos. Fonte: Elzinga et al. (2015).

Dados da Brewers Association (Associação de Cervejarias Norte Americanas) indicam um crescimento de 6,2% do mercado de cervejas artesanais no ano de 2016, atingindo uma fatia de 12,3% do mercado dos Estados Unidos. Estes dados acompanham também o crescimento do número de cervejarias, sendo que em 2016 foram contabilizadas 5.301 cervejarias norte americanas, sendo 5.234 artesanais. Já no Brasil há em torno de 300 cervejarias artesanais comerciais.

3.2 Produção de cerveja

Não se tem registro do exato momento do surgimento da cerveja na civilização humana. As evidências mais antigas encontradas datam desde a mesopotâmia, 6.000 ou 7.000 anos atrás (FERGUS G. PRIEST, G. G. S, 2006). Desde então diversos ingredientes já foram utilizados para sua produção como por exemplo, mel, frutas e ervas aromáticas (MCGOVERN, P. et al., 2004). O lúpulo foi um dos últimos ingredientes a serem introduzidos na receita, somente no séc. X que se tem os primeiros registros de sua utilização (MEUSSDOERFFER, F. G, 2009). Já no século XV o lúpulo se impõe como principal aromatizante e conservante da bebida. Em 1516, o Duque Wilhelm IV da Baviera promulga a Lei da Pureza, a *Reinheitsgebot*. Esta lei determinava que os únicos ingredientes que poderiam ser utilizados para fabricação da cerveja eram água, malte e lúpulo (HACKEL - STEHR, K., 1987, apud MEUSSDOERFFER, F. G, 2009). Naquele momento ainda se desconhecia a ação das leveduras, que posteriormente foram acrescentadas à lei. Porém, até o momento, diversos ingredientes continuam sendo utilizados para produção de cerveja e com o crescimento das cervejas artesanais, novas receitas surgem e novos ingredientes são incorporados, embora, a base continue sendo a mesma, tendo como principais ingredientes água, malte, lúpulo e a levedura.

3.2.1 Água

A água corresponde a cerca de 95% da composição da cerveja, e tem grande importância em todos os aspectos nas características do produto. As cervejarias, historicamente, se instalavam próximas às fontes de água, e as características da água influenciavam diretamente o sabor e aroma das bebidas. Isso fez com que regiões ficassem conhecidas por seus estilos de cervejas. Atualmente as cervejarias têm capacidade para adaptar e tratar a água de forma específica para cada receita (FERGUS G. P. e GRAHAM, G. S., 2006).

A composição de íons da água é extremamente importante no controle do pH durante o processo de mosturação, assim como pode afetar diretamente a etapa de fermentação. Compostos como Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Mg^{2+} , K^{+} e Fe^{2+} , por

exemplo, são fundamentais para o desenvolvimento das leveduras (FERGUS G. P. e GRAHAM, G. S., 2006).

Durante a fervura do mosto o pH irá influenciar a solubilidade dos α -ácidos, que são mais solúveis a valores de pH mais elevados. Porém, com a precipitação de fosfatos e proteínas complexadas com cálcio o pH tende a decrescer durante esta etapa. Já, durante a fermentação, o pH cai devido ao consumo de compostos tamponantes do mosto, como por exemplo os aminoácidos livres presentes, e pela produção de ácidos orgânicos e secreção de íons H^+ pelas leveduras (FERGUS G. P. e GRAHAM, G. S., 2006).

3.2.2 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma trepadeira da família *Cannabaceae*. Em torno de 97% da produção de lúpulo é designada para a indústria cervejeira. Os principais produtores são Alemanha e Estados Unidos. Para produção de cerveja são utilizadas as flores da planta fêmea, também conhecidas como cones. A colheita ocorre entre o final do verão e o início do outono, quando as flores são secas e armazenadas sob refrigeração até sua utilização (ALMAGUER et al, 2014). Nestas flores se encontram resinas ricas em α -ácidos, β -ácidos e outras resinas. Os α -ácidos são os principais componentes de amargor, são solúveis em água e são isomerizados durante a fervura e clarificação do mosto, tornando-se mais solúveis. Já os β -ácidos pouco contribuem com o amargor, são menos solúveis e quase não sofrem alterações durante a fervura do mosto (O'ROURKE, T., 2003).

Outros compostos de extrema importância para a produção de cerveja são os óleos essenciais presentes na flor do lúpulo, que representam sua parte volátil. Estes compostos vão proporcionar sabor e aroma e correspondem de 0,5 a 3% das flores secas (ALMAGUER et al, 2014)

3.2.3 Malte

O malte é principalmente obtido a partir da cevada, por meio de um processo de germinação controlado. O malte de cevada possui composição rica em amido e o processo de maltagem proporciona a ativação das enzimas presentes na cevada,

que serão fundamentais para a quebra do amido em açúcares fermentescíveis durante a produção do mosto. Além disso, o malte também possui outros componentes, como proteínas, vitaminas, minerais, polifenóis, nucleotídeos e lipídeos que serão essenciais para o desenvolvimento da levedura na etapa de fermentação (BOULTON e GUAIN, 2001).

3.2.4 Leveduras cervejeiras

A principal espécie de leveduras cervejeiras é a *Saccharomyces cerevisiae*, utilizada em cervejas de alta fermentação (15 a 20°C). Leveduras desta espécie também são utilizadas nos produtos de panificação, vinho, entre outras aplicações. Para cervejas de baixa fermentação (10°C ou abaixo), a espécie *Saccharomyces carlsbergensis* é utilizada. Existem diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na produção de cerveja, sendo que cada uma pode conferir diferentes características ao produto final, como produção de compostos aromáticos (álcoois superiores e ésteres) (FERGUS G. P. e GRAHAM, G. S., 2006). Foi identificado que devido à presença de um gene específico (POF, PAD1), cepas utilizadas na produção de cervejas de trigo produzem aromas de cravo e baunilha (MEADEN e TAYLOR, 1991). A variação de compostos fenólicos voláteis entre diferentes cervejas e estilos de cervejas pode ser explicada pela alteração da atividade da enzima Pad1 observada entre diferentes cepas de levedura de alta fermentação (VANBENEDEN et al., 2008).

3.3 Etapas da produção da cerveja

A produção de cerveja consiste em 8 principais etapas, malteação, moagem, mosturação, separação do mosto, fervura, fermentação, maturação e envase. Consiste basicamente na extração do amido do malte de cevada e sua sacarificação para posterior fermentação pelas leveduras. Na Figura 2 é apresentado um fluxograma simplificado do processo.

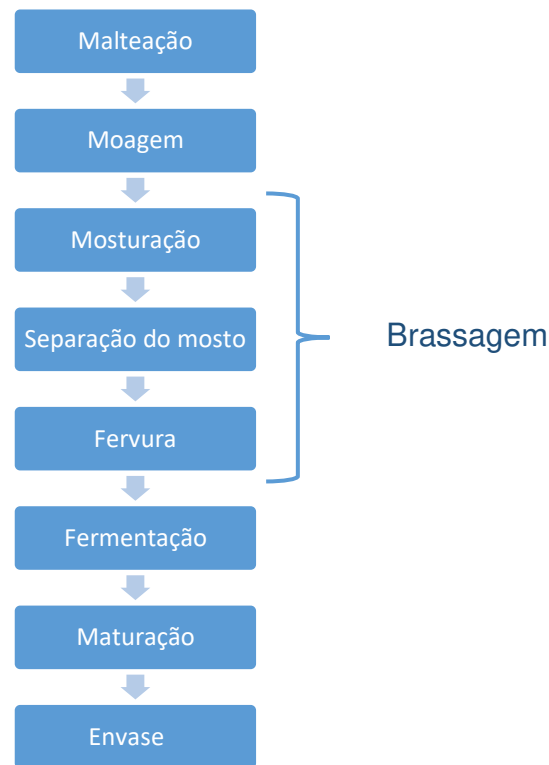


Figura 2: Etapas do processo de produção de cerveja.

3.3.1 Malteação

A malteação tem início com a umidificação do grão de cevada e é formada uma cama de grãos que irão germinar e formar raízes. Esta cama é mantida em temperatura e umidade controlada. Os grãos passam a produzir diversas enzimas, como por exemplo α e β amilases. Então este processo de germinação é interrompido com aplicação de calor através da circulação de ar quente entre os grãos. Este processo além de secar também contribuir para formação de cor e sabor do malte. Em seguida, as raízes são separadas mecanicamente e o malte armazenado para uso posterior (FERGUS G. PRIEST, G. G. S, 2006).

Embora o malte proveniente do grão de cevada seja o mais utilizado, na indústria cervejeira podemos encontrar produtos obtidos com a utilização de malte de diversos outros cereais como por exemplo, trigo, centeio, e aveia e sorgo. Este último é bastante utilizado na produção de cerveja no continente africano como substituto do malte de cevada (FERGUS G. PRIEST, G. G. S, 2006).

3.3.2 Moagem

O malte é moído de forma expor o endosperma do grão. Sendo assim, seus componentes ficam mais expostos para a reação de sacarificação. Ao malte moído é adicionada água que sob aquecimento dá início ao processo de mosturação

3.3.3 Brassagem

A etapa de brassagem envolve a mosturação, separação do mosto e a fervura.

A mosturação é a etapa do processo de produção de cerveja na qual as enzimas presentes na cevada germinada (principalmente a α e a β amilase) atuam nas moléculas de amido, resultando, principalmente, em maltose e outros açúcares. Esta etapa também pode ser designada sacarificação (FERGUS G. P. e GRAHAM, G. S., 2006). Estes açúcares serão utilizados como substrato para o processo de fermentação. Na mosturação a temperatura não pode ultrapassar 72°C para que não haja desnaturação das enzimas (ROSA e AFONSO, 2015). Os parâmetros desta etapa podem ser alterados para atingir uma determinada composição do mosto. O principal produto da ação da β -amilase é a maltose, enquanto que a α -amilase produz diferentes moléculas, desde glucose, maltose e maltotriose (fermentescíveis) a moléculas com alto peso molecular como dextrinas (não fermentescíveis) (MULLER, 1997).

Diferentes rampas de temperaturas são usadas no processo de mosturação. Este processo varia de acordo com o estilo de cerveja e das características que o cervejeiro pretende no produto final. Geralmente cervejas de alta fermentação utilizam apenas uma temperatura durante toda a mosturação, por exemplo 65°C por 1 hora. Este processo é favorável tanto para a formação de açúcares fermentescíveis como no nitrogênio total livre. Temperaturas mais baixas (50-55°C) na mosturação favorecem a ação de proteases aumentando as concentrações de amino-nitrogênio livre. Temperaturas mais altas (65-70°C) favorecem ação de enzimas amilolíticas, aumentando a concentração de açúcares fermentescíveis (BOULTON e QUAIN, 2001).

Na fervura, etapa subsequente à mosturação, ocorre a adição do lúpulo ao mosto, com a incorporação de compostos ligados ao aroma e amargor da cerveja. Os α -ácidos presentes no lúpulo são os compostos responsáveis pelo amargor. Na fervura, eles são solubilizados no mosto e isomerizados. Logo após a fervura, o mosto é resfriado e segue para a etapa de fermentação (ROSA e AFONSO, 2015). Além de favorecer a isomerização dos α -ácidos, a fervura também tem como função esterilizar o mosto, encerrar qualquer atividade enzimática remanescente, eliminar alguns compostos voláteis (por exemplo, dimetil sulfito que pode conferir sabor de vegetal cozido à cerveja) e ajudar na clarificação da bebida (favorecendo a reação entre polifenóis e proteínas, formando compostos insolúveis, e precipitando de proteínas. Essa mistura resultante é chamada de “Trub”) (BOULTON e QUAIN, 2001).

Após a fervura a o mosto é resfriado por trocador de calor a placas para a temperatura de fermentação.

3.3.4 Fermentação

A fermentação da cerveja é uma etapa em que ocorrem diversas transformações bioquímicas, com a ação das leveduras. Os açúcares presentes no mosto são transformados em etanol e CO₂, através do metabolismo das leveduras (GRASSI et al., 2014; GIOVENZANA et al., 2014). É uma das etapas mais delicadas para a produção da bebida (GIOVENZANA et al., 2014).

Mais detalhadamente, nesta etapa, a ação das leveduras está relacionada à metabolização de açúcares e amino ácidos e produção de etanol, CO₂ e compostos secundários de aroma, como ésteres, álcoois superiores, compostos sulfurados, ácidos orgânicos, aldeídos e cetonas. Resumidamente, o desenvolvimento da etapa de fermentação está relacionado à composição do mosto preparado e ao tipo e condição da levedura utilizada (GRASSI et al., 2014; GIOVENZANA et al., 2014).

De acordo com o tipo de fermentação, as cervejas podem ser divididas em *ales* e *lagers*. As *ales* são conhecidas pela alta fermentação (pela *Saccharomyces cerevisiae* entre 18 e 22°C) e as *lagers* são conhecidas pela baixa fermentação (pela *Saccharomyces carlsbergensis* entre 6 e 15°C) (GIOVENZANA et al., 2014). É importante que haja um bom controle da temperatura para o bom desenvolvimento das leveduras durante a fermentação (ROSA e AFONSO, 2015).

3.3.5 Maturação

Após a etapa de fermentação, ocorre redução da temperatura da cerveja até 0°C, condição em que ocorre o processo de maturação. Com a redução da temperatura há a decantação da levedura. Na maturação, ocorre estabilidade coloidal da cerveja e o sabor da cerveja é aprimorado (BOULTON e QUAIN, 2001; Rosa e Afonso, 2015), principalmente pela reabsorção pelas leveduras de substâncias de compostos indesejáveis produzidos durante a fermentação, como por exemplo o diacetil que é reduzido para acetoína e butano-1,4-diol (BOULTON e QUAIN, 2001; FERGUS G. PRIEST, G. G. S, 2006).

Ao final da maturação a cerveja pode ser centrifugada (este processo pode reduzir a etapa de maturação, pois substitui a decantação da levedura e de partículas não solúveis formadas no processo) e filtrada para remoção da levedura residual e dar maior limpidez ao produto final (FERGUS G. PRIEST, G. G. S, 2006).

3.3.6 Envase

O fator mais crítico no processo de envase é a incorporação de oxigênio. Para minimizar este fato, os equipamentos e linhas dos processos que precedem o envase são purgados com CO₂. Como por exemplo, a alimentação do filtro e o tanque que alimentará o equipamento de envase. Após o envase a cerveja pode ou não ser pasteurizada. Caso não seja, cuidados adicionais no processo de envase devem ser tomados para evitar a contaminação do produto (FERGUS G. PRIEST, G. G. S, 2006). A pasteurização busca a estabilidade microbiológica para atender a vida de prateleira, mas sem prejudicar a qualidade do produto final. Pode ser realizada por túnel após o envase ou por *flash* pasteurização (trocador a placas). No primeiro método o produto é submetido a temperatura de 60°C por 20 a 30 minutos, enquanto que na *flash* pasteurização atinge 70°C por 20 a 30 segundos (BOULTON e QUAIN, 2001).

3.4 Lúpulo e os Iso- α -ácidos

Durante o processo de fervura e clarificação do mosto, no qual ocorre a isomerização dos α -ácidos, a densidade específica do mosto afeta de forma significativa a taxa desta reação. A formação dos α -ácidos está apresentada na Figura 3. Quanto maior a densidade, menor o fator de utilização dos α -ácidos (fator que representa quantidade α -ácidos convertida em iso- α -ácidos presentes no produto final). O aumento da densidade gera maior sedimentação dos compostos que ocorre durante a fervura resultando então na redução da utilização dos α -ácidos adicionados ao processo. Além disso, um pH mais elevado do mosto aumenta a taxa de isomerização dos α -ácidos. O tempo de fervura do mosto também impacta na eficiência da isomerização dos α -ácidos, sendo que quanto maior o tempo maior a fator de utilização, porém há uma maior eficiência com 90 minutos a 100°C (LIU et al., 2009; FERGUS G. PRIEST, G. G. S, 2006).

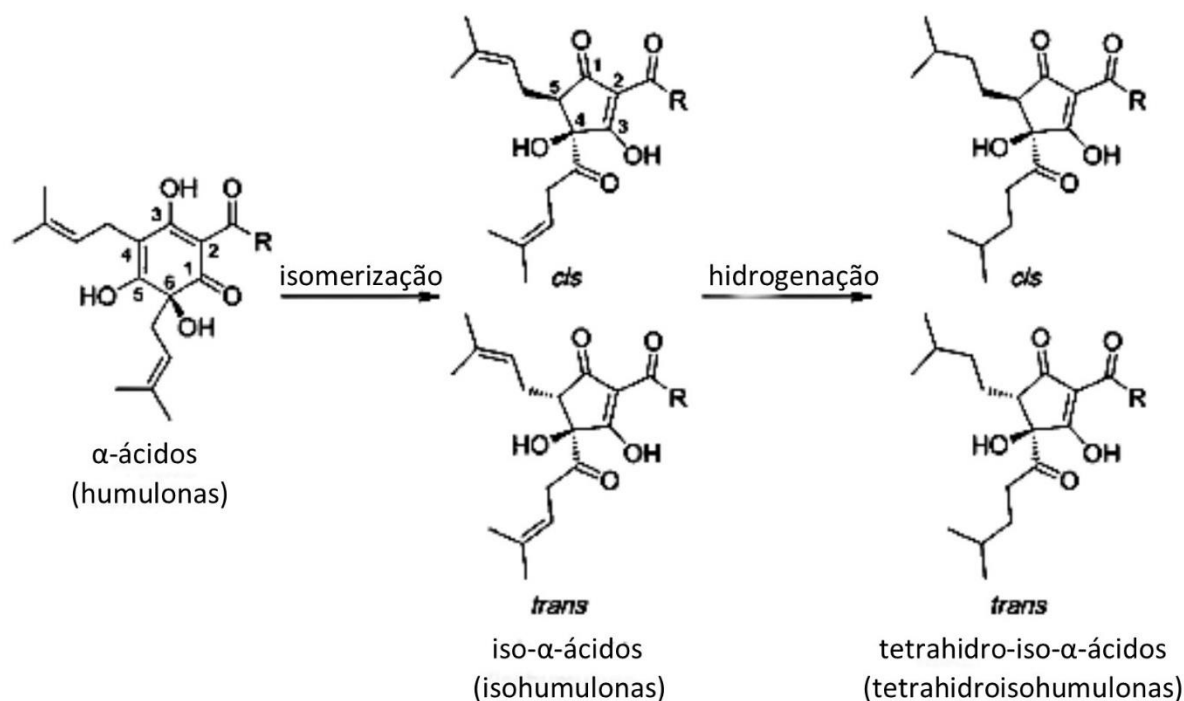


Figura 3. Isomerização dos α -ácidos durante fervura. Humulona: R=isobutil, cohumulona: R=isopropil, adhumulona: R=sec-butil (URBAN et al., 2013).

O melhor aproveitamento dos α ácidos é uma busca da indústria cervejeira, ou seja, são subaproveitados ou por não serem isomerizados, ou então, por perdas no processo até o produto final. O desenvolvimento de novos produtos e meios para adição destes à cerveja vêm sendo estudados como forma de promover maior consistência e uma redução de custos (WHITEAR, 1986) apud (HUGHES e SIMPSON, 1993). Este aproveitamento é medido pelo fator de utilização (%), que reflete a porcentagem de α -ácidos isomerizados na cerveja final frente aos α -ácidos presentes no lúpulo utilizado na fabricação (MCMURROUGH; CLEARY; MURRAY, 1986).

O fator de utilização dos α -ácidos pode ser maior com o uso de produtos derivados do lúpulo, como por exemplo, extrato isomerizado, extrato de lúpulo, *pellets* enriquecidos entre outros, principalmente quando são produtos já isomerizados que não precisam contar com a eficiência da isomerização que ocorre na fervura. O momento do processo em que estes compostos são adicionados é importante, já que se adicionados antes da fermentação e filtração da cerveja pode haver a perda dos iso- α -ácidos. A adição após estas etapas aumentará o fator de utilização (HUGHES e SIMPSON, 1993).

Os α -ácidos provenientes do lúpulo adicionado ao mosto resultam em duas formas de iso- α -ácidos, *cis* e *trans* (Spetsig, 1958, apud Almaguer et al., 2014). Os isômeros na sua forma *cis* possuem amargor mais elevado que na forma *trans*. Dos seis principais α -ácidos da cerveja, aquele com maior poder de amargor é a *cis*-isohumulona, enquanto que o com menor poder de amargor é a isocohumulona (HUGHES E SIMPSON, 1996, apud ALMAGUER et al., 2014).

De forma a mensurar o amargor da cerveja foram desenvolvidos métodos para realizar a extração dos iso- α -ácidos. Em 1955, Rigby e Bethune, realizaram a extração destes compostos com iso-octano em cerveja acidificada diluída em metil-álcool e mediram a absorção da luz ultravioleta a 255nm, para estimar a concentração dos mesmos. Os resultados obtidos foram correlacionados com um painel sensorial de forma satisfatória. Posteriormente, Rigby e Bethune (1955), aprimoraram este método purificando o iso-octano com metanol acidificado e obtiveram resultados ainda mais acurados. Também no ano de 1955, Moltke e Meilgaard apud (BISHOP, 1967), realizaram um método semelhante, porém com a medição em ultravioleta à 275nm, com cerveja acidificada, mas sem qualquer outro

tratamento. A diferença entre os dois é que o aplicado por Rigby e Bethune quantifica a iso-humulona, enquanto que o método de Moltke e Meilgaard a iso-humulona e outros compostos, que também conferem amargor a cerveja. Em 1967, Bishop, discute os resultados obtidos por cada método e reporta a decisão de se adotar um único método pela *American Society of Brewing Chemists* e a *European Brewery Convention*. Sendo assim, as unidades de amargor obtidas pelo método aplicado por Moltke e Meilgaard devem ser calculadas pela Equação 1, com isso resultados semelhantes aos apontados por Rigby e Bethune são alcançados com o benefício de se mensurar outros compostos de amargor além do iso-humulona (BISHOP, 1967).

$$\text{BU (Bitterness Unit)} = \text{Absorbância}_{275\text{nm}} \times 50. \text{ (Eq. 1)}$$

Em 1968, esta metodologia passou por um estudo colaborativo entre laboratórios com amostras de cervejas fabricadas com lúpulos novos e velhos. Os erros obtidos foram considerados pequenos (HOWARD, 1968). Novamente, no ano 2000, foi testada a reprodutividade e repetitividade deste método e os resultados foram considerados satisfatórios (BENARD, 2000).

Entre as décadas de 1970 e 2010 a média de adição de α -ácidos em cerveja passou de 9,6 para 4,1 g/hl. Os fatores para esta redução foram o melhor aproveitamento dos compostos de amargor e o enorme crescimento de mercados consumidores de cervejas com menor amargor, como Estados Unidos e China. Além disso, é evidenciada uma redução do amargor da cerveja mundialmente, resultado de uma mudança na preferência dos consumidores. Já no ano de 2012 é possível verificar um movimento inverso, com um aumento do consumo de α -ácidos por hl que passou para 4,3 g/hl. Este aumento é atribuído ao aumento da produção de cervejas artesanais com maior quantidade de lúpulo, para obtenção de um produto com amargor mais elevado e com mais presença de sabores e aromas provenientes deste ingrediente (ALMAGUER et al., 2014). Este movimento ocorre em grande parte nos Estados Unidos e outros países como Itália, Argentina e Brasil.

A produção de cervejas artesanais norte americana atinge cerca de 1% da produção mundial, mas consome em torno de 10% da produção de lúpulo mundial. É importante ressaltar que este segmento cresce a uma taxa de 15% ao ano e se

espalha pelo mundo. Esta pequena movimentação fez com que pela primeira vez, desde 2008, ocorresse um aumento na área de plantio de lúpulo no mundo, aumento impulsionado principalmente pelos Estados Unidos (ASSOCIATION GERMAN HOP INDUSTRY, 2014). Entre os anos de 2004 e 2013 houve um aumento de 90% no preço dos lúpulos americanos (HOP GROWERS OF AMERICA, 2014). Por ser um ingrediente quase 100% importado, no Brasil, o preço do lúpulo também é influenciado pelo câmbio, impactando diretamente nos custos de produção.

Diante deste cenário é importante o melhor aproveitamento dos α -ácidos do lúpulo no processo de fabricação da cerveja. Porém, o processo de isomerização durante a fervura não é totalmente eficiente e apenas 50% dos α -ácidos são isomerizados (dependendo de alguns fatores). Além disso, apenas 25% do amargor potencial permanece na cerveja (BAMFORTH, 2000).

Em estudo realizado por BENITEZ et al. (1997) são apontados fatores como a transferência dos α -ácidos do lúpulo, a solubilidade destes em meio aquoso e o pH (5,0 - 5,5) do mosto como importantes para o fator de utilização sob condições reais de fabricação, atingindo ao final da fervura em torno de 50%, semelhante ao apontado por BAMFORTH (2000). Porém, após a fervura do mosto, DE COOMAN (2007) verifica a perda de iso- α -ácidos durante as demais etapas de fabricação, principalmente durante a fermentação, resultando em um fator de utilização final de 30 a 40 %.

3.5 Perda de amargor (iso- α -ácidos) durante os processos

Laws et al. (1972) estudaram a perda de amargor durante o processo fermentativo. Em seus resultados é possível observar uma perda considerável de α e iso- α -ácidos durante a fermentação da cerveja (84% e 31% de perda respectivamente). Neste estudo foi possível contabilizar 93% das substâncias de amargor perdidas durante a fermentação. Sendo assim, pouco foi metabolizado pela levedura. A maior perda ocorreu pela espuma que ficou aderida às paredes do tanque de fermentação, seguida pela suspensão de leveduras na superfície da cerveja. Perdas relacionadas às leveduras em suspensão e às leveduras que se depositaram foram pequenas (representando entre 10 e 12% das perdas). Com a

finalidade de recuperar estes compostos, foi estudado o ganho obtido com a reincorporação da espuma aderida às paredes do tanque à cerveja. Nas cervejas em que a reincorporação foi realizada somente após 18 horas de fermentação, apesar de se obter o ganho dos compostos, foi observado que a cerveja continua formando espuma e novamente aderindo as paredes do tanque. Já, nas cervejas em que a formação de espuma foi controlada com uma reincorporação constante durante as primeiras 30 horas de fermentação, foi possível obter uma maior taxa de utilização dos α -ácidos. Aparentemente ao ficar muito tempo na superfície, os compostos de amargor são parcialmente oxidados, dificultando assim a dissolução na cerveja.

Neste mesmo estudo Laws et al. (1972) avaliaram o comportamento dos α -ácidos no mosto lupulado em que foi injetado CO_2 por 20 a 30 minutos. Foi avaliada uma concentração de substâncias de amargor na espuma que se formou, repetindo o mesmo experimento, mas com a adição de etanol (1%) e observou-se que há uma redução da concentração de α -ácidos na espuma. Além do dióxido de carbono foi avaliada se havia diferença nos resultados com a utilização de nitrogênio. Foram obtidos resultados semelhantes indicando não haver uma relação específica com o CO_2 . De acordo com estes resultados, Laws et al. (1972) realizaram uma fermentação de um mosto com e sem adição de etanol (1%) antes de inocular a levedura para avaliar a concentração dos α -ácidos. Como esperado houve um aumento na concentração de α -ácidos (2,4 ppm no mosto padrão e 3,6 no mosto com adição de etanol) e iso- α -ácidos (14,6 ppm no mosto padrão e 17,3 ppm no mosto com adição de etanol).

Outro fator no processo de fermentação é a densidade específica do mosto. Conforme abordado anteriormente, sabe-se que esta medida afeta diretamente o fator de utilização dos α -ácidos, parâmetro este muito bem estudado no processo de fervura do mosto. Com a finalidade de entender as perdas de α -ácidos, durante o processo de fermentação variando a densidade do mosto Laws et al. (1972) prepararam mosto nas densidades 1,030, 1,040 e 1,050 g/cm^3 e aos quais foram adicionados extrato de lúpulo, fervidos e fermentados. Pode-se observar que a cerveja obtida com o mosto de maior densidade (1,050 g/cm^3) foi a menos amarga e a de menor densidade (1,030 g/cm^3) a mais amarga. Com o aumento da densidade obteve-se uma maior perda dos compostos de amargor na espuma formada durante

a fermentação. Após 18 horas de fermentação havia pouca formação de espuma no mosto a 1,030 g/cm³ de densidade, diferentemente do mosto a 1,050 g/cm³. O mosto a 1,050 g/cm³ continha inicialmente 830 mg de iso- α -ácidos no total, destes 436 mg foram quantificados na cerveja obtida, enquanto que no mosto de menor densidade com 840 mg de iso- α -ácidos no total a quantidade recuperada no produto final foi de 646 mg ambas as fermentações partiram com de 27 litros de mosto. As perda de iso- α -ácidos durante a fermentação foram de 23%, 32% e 47% para os mostos a 1,030, 1,040 e 1,050 g/cm³ de densidade específica (extrato original) (LAWS et al, 1972).

Outro fator que pode afetar a perda dos compostos de amargor durante a fermentação é a levedura. Verbelen et al. (2009), verificaram o impacto da concentração de inóculo de *S. cerevisiae* na fermentação de um mosto com extrato original de 15°P e 404 ppm de amino-nitrogênio livre (*Free Amino Nitrogen*). As concentrações de inóculo utilizadas neste estudo foram de 10, 20, 40, 80 e 120 x 10⁶ células/mL de mosto. Diante dos resultados obtidos foi possível observar uma redução no tempo de fermentação em 60%. O consumo dos amino-nitrogênio livres reduziu com a elevação da concentração de inóculo. A contagem de células totais aumentou com o aumento da concentração de inóculo. Mesmo assim, a concentração de etanol não variou de acordo com a concentração de inóculo utilizada na fermentação. Já o pH foi mais baixo quanto maior a concentração. Com relação ao amargor medido em unidades de amargor (*Bitterness Units*) de acordo com o método da EBC (*European Brewery Convention*), não houve diferença entre as diferentes concentrações de inóculo. Os dados obtidos neste estudo estão expressos na Tabela 1:

Tabela 1 - Teor alcoólico, pH e amargor em fermentações com diferentes concentrações de inóculo.

	Concentrações de inóculo (células/mL)				
	10x10 ⁶	20x10 ⁶	40x10 ⁶	80x10 ⁶	120x10 ⁶
Álcool (% v/v)	6,77±0,18	6,69±0,06	6,61±0,03	6,61±0,01	6,68±0,00
pH	4,45±0,01	4,46±0,02	4,30±0,01	4,2±0,01	4,24±0,01
Amargor (BU)	21,8±0,1	20,7±1,6	20,4±0,3	20,5±1,3	24,5±0,3

Fonte: Verbelen et al. (2009).

Os trabalhos encontrados na literatura não apresentaram resultados ao longo do processo de fermentação e não houve avaliação do processo de maturação da cerveja. Estes foram objetos de estudo do presente trabalho. Vale ressaltar também que os estudos apresentados utilizaram diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e diferentes concentrações de inóculo.

4. Materiais e Métodos

O plano de trabalho seguiu o fluxograma exposto na Figura 4.

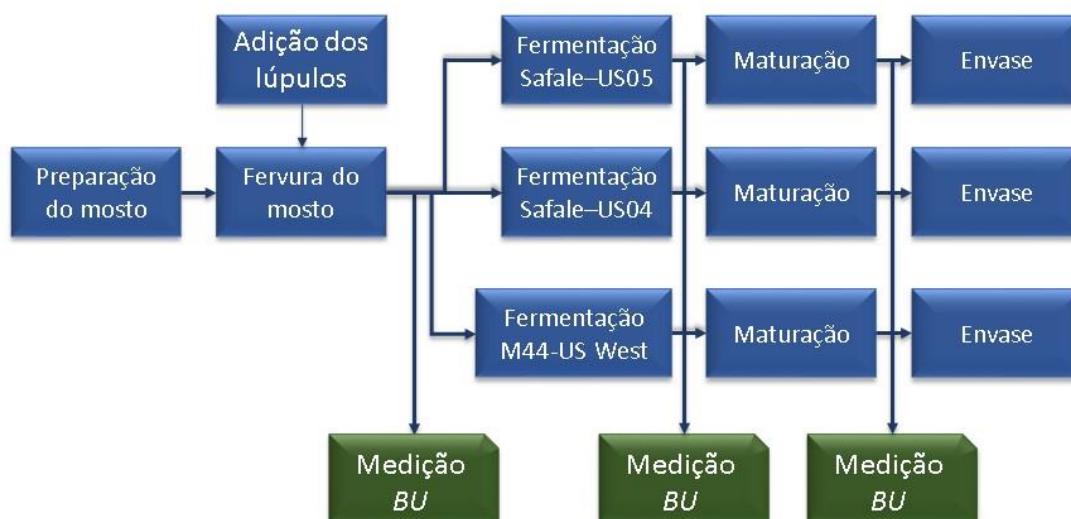


Figura 4. Fluxograma de trabalho

Os ensaios de fermentação e maturação foram realizados em triplicata para cada levedura e concentração de inóculo. As análises de unidade de amargor (BU), pH, contagem de células em suspensão, teor de álcool, extrato real e atenuação foram realizadas no mosto e nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11 e 14 (fermentação) e no dia 23 (pós maturação) subsequentes à inoculação da levedura, sendo que o dia 1 é igual 24 horas após a inoculação. As amostras foram codificadas conforme Tabela 2.

Tabela 2. Codificação dos ensaios realizados para cada cepa de levedura e concentração de inóculo.

Levedura	Concentração de inóculo cel./mL. °P		
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵
Fermentis - Safale - US05	A7	A6	A5
Fermentis - Safale - US04	B7	B6	B5
Mangrove - M44 - US West Coast	C7	C6	C5

4.1 Micro-organismos

As leveduras avaliadas neste estudo foram diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*:

- Safale - US05, fabricante Fermentis, levedura seca.
- Safale - US04, fabricante Fermentis, levedura seca.
- M44, US West Coast, fabricante Mangrove Jack's, levedura seca.

Estas cepas foram escolhidas por serem bastante utilizadas para fabricação de cervejas especiais, nas quais dependendo do seu estilo o amargor é um atributo determinante na caracterização do produto.

4.2 Fabricação do Mosto

O mosto foi obtido a partir do extrato de malte seco da Liotécnica SEM-100 (controle MI116 – validade 04/2016), água mineral Bonafont – Danone e lúpulo em pellets, variedade Nugget (α -ácido 17,1%) safra 2013. Para a preparação do mosto foi utilizado tanque de aço inoxidável com fonte de aquecimento por resistência elétrica (MecHobby 50Plus) (figura 5). Foram adicionados 54 litros de água e 6kg do extrato de malte no equipamento e foi realizada a verificação da densidade e temperatura inicial do mosto com densímetro marca Incoterm (escala 1,000 a 1,100 g/cm³) e termômetro digital, tipo espeto com alarme da marca Incoterm para correção da leitura. A 50°C a leitura de 1,031 g/cm³ para densidade corresponde a 1,042 g/cm³ à 25°C.

A mistura foi fervida por uma hora e no início da fervura ocorreu a adição do lúpulo (110g em 60 litros de mosto). Após a etapa de fervura o mosto foi resfriado a temperatura de 18°C com o uso de um *chiller* de imersão, trocando calor com água a 2°C. A 25°C foi verificada a densidade específica do mosto com 1,0476g/cm³, o que corresponde à um extrato com 11,8°P.

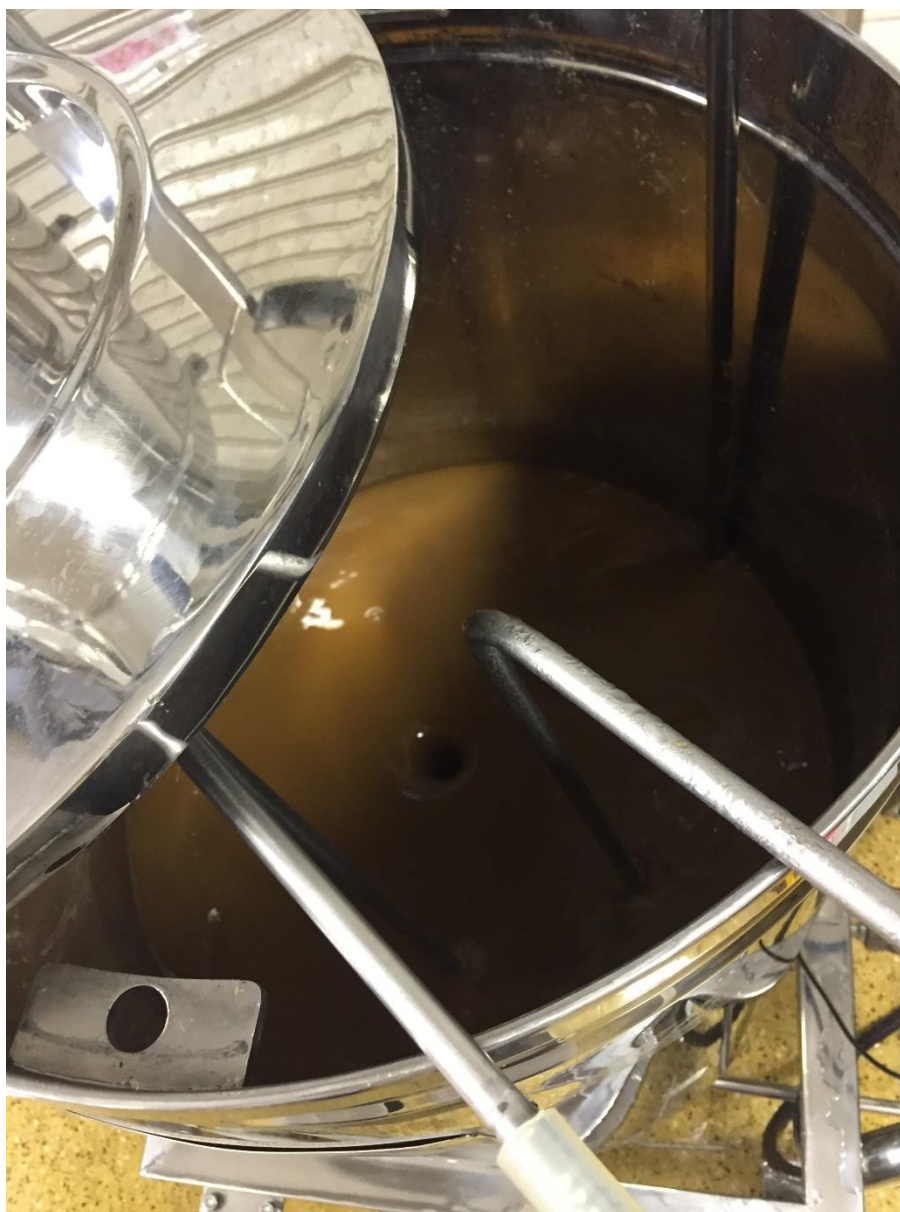


Figura 5. Preparação do mosto no equipamento MecHobby 50Plus.

4.3 Fermentação

Para o processo de fermentação o mosto foi dividido em 27 amostras de 1500 mL, cada qual acondicionada em frascos de vidros com capacidade de 2 L (Figura

6), nos quais foram inoculadas as leveduras nas diferentes concentrações de inóculo. As leveduras liofilizadas foram previamente reidratadas com água (10ml/g de fermento seco) a 27°C por 30 minutos. Posteriormente à ativação, determinou-se a contagem de células vivas de cada lote. A contagem de células vivas de levedura foi realizada seguindo o método *Yeast-3*, *Yeast Stains* da ASBC (ASBC, 2015), com microscópio óptico (400 – 500x), câmara de Neubauer e reagente azul de metileno.



Figura 6. Frascos de fermentação do dia 2 para amostras da levedura Mangrove – M44 – US West Coast. Da esquerda para direita as concentrações de inóculo são 10^7 , 10^6 e 10^5 cel./mL.

As amostras foram inoculadas nas concentrações de inóculo de 10^5 , 10^6 e 10^7 de células por mL de mosto.^oP, e então, mantidas a temperatura de 18°C por 14 dias. Após o 14° dia, as amostras foram acondicionadas a 0°C para a etapa de maturação.

O teor de álcool e as medidas de extrato real e aparente foram realizadas pelo *Beer Analyzing System* (Anton Paar).

As análises de amargor, contagem de células, e parâmetros físico-químicos foram realizadas antes (mosto) e durante a fermentação nos dias 1, 2, 3, 4, 5 (dias de maior intensidade a atividade da levedura) e 7, 9, 11 e 14 (dias em que a atividade da levedura é mais lenta indicando o termino da fermentação) e após a maturação (dia 23) para avaliar o efeito da fermentação nos parâmetros analisados.

4.4 Análises

4.4.1 Medida de Amargor - Bitterness Units (BU)

As unidades de amargor foram determinadas pelo método *Beer-23B*, *Beer Bitterness*, da ASBC (ASBC, 2015).

Foram utilizados como reagentes isooctano (2,2,4-trimetilpentano) 99%PA e ácido clorídrico 37% PA.

Para análise de amargor do mosto, foram adicionados em tubo de centrifuga de 50 mL de capacidade 5 mL de mosto, 5 mL de água, 1 mL de solução de ácido clorídrico 3 M e 20 mL de isooctano. Os tubos foram homogeneizados e colocados no agitador (mesa agitadora – Tecnal) por 15 minutos e 100 BPM. Em seguida, foram centrifugados (centrífuga modelo Omega I) por 5 minutos a 1164xg (2600rpm) até a separação de fases. O espectrofotômetro (Beckman - Du-70 Spectrophotometer) foi calibrado apenas com isooctano e então foram lidas as absorbâncias das amostras a 275nm, realizando-se a limpeza das cubetas de quartzo com isooctano entre a leitura de uma amostra e outra.

O BU foi calculado através da equação 2:

$$BU = Abs_{275nm} \times 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

No caso da análise de amargor da cerveja, foram transferidos 5,0mL de cerveja gelada e carbonatada, usando uma pipeta volumétrica de 5,0mL, para um tubo da centrifuga de 50mL. Em seguida, foram adicionados 0,5mL de 3M HCl ao tubo de centrífuga e 10mL de isooctano. Foi preparada uma amostra “controle” usando 10mL de isooctano com 0,5mL de 3N HCl. Os tubo foram agitados manualmente de duas a três vezes e em um agitador mecânico por 15 minutos a 100 BPM. Os tubos foram centrifugados em centrífuga modelo Omega I por 5

minutos a 1164xg (2600rpm) até a separação de fases. O líquido da camada superior de isooctano foi transferido para a cubeta de quartzo. O espectrofotômetro (Beckman - Du-70 Spectrophotometer) foi calibrado a 275nm com o “controle”. Em seguida, foi feita a leitura das amostras a 275nm. O cálculo foi realizado de acordo com a Equação 3, sendo o valor sempre expresso em números inteiros.

$$\text{BU (Bitterness Unit)} = \text{Absorbância (275 nm)} \times 50. \text{ (Eq. 3)}$$

4.4.2 Contagem de células

No caso do fermento seco reativado, foram adicionados 10mL de água destilada para cada grama de fermento liofilizado, a aproximadamente 27°C. Após reconstituição, foi preparada uma solução adicionando $1 \pm 0,1$ g de fermento úmido em um Erlenmeyer e completado seu peso até $100 \pm 0,1$ g com solução de água salina 0,85%. No caso das contagens de células durante a fermentação, demais diluições foram necessárias, de forma a atingir uma contagem entre 5 e 20 células por quadrante. A solução foi agitada até a homogeneização total. Foram então adicionados, em um tubo de vidro, 1 mL dessa solução diluída para 1 mL de azul de metileno (0,01g/100mL). Uma gota dessa nova solução foi transferida para a cavidade da câmara de Neubauer e coberta com uma lamínula. A lâmina foi posicionada no microscópio (Axiostar – Zeiss) onde foi realizada a contagem de células. Por fim, foram contadas as células de 5 quadrantes e em seguida contadas somente as células vivas dos mesmos quadrantes (células não coradas – não azuis). Após a contagem, foram calculados: o número total de células e o número de células vivas por mL, através das Equações 4 e 5:

$$\frac{N^{\circ} \text{ cel totais}}{\text{mL}} = n^{\circ} \text{ cel contadas} \times \text{fator de diluição} \times \text{volume do quadrado da câmara} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\frac{N^{\circ} \text{ cel vivas}}{\text{mL}} = n^{\circ} \text{ cel vivas contadas} \times \text{fator de diluição} \times \text{volume do quadrado da câmara} \quad (\text{Eq. 5})$$

O número de células vivas por mL foi utilizado para calcular a quantidade de levedura em gramas que foi inoculada para obter as concentrações desejadas.

4.4.3 Análises físico-químicas

- **pH**

O pH foi determinado por leitura direta em potenciômetro calibrado com soluções tampão pH 4 e 7, marca Digimed, modelo DM-70, segundo o método *Beer-9, pH* (ASBC, 2015).

- **Teor de álcool**

O teor alcoólico foi determinado por leitura direta do equipamento Alcolyzer Beer - Anton Paar.

- **Taxa de atenuação (*RDF – Real Degree of Fermentation*)**

A taxa de atenuação (porcentagem de consumo de extrato real durante a fermentação) informa em termos percentuais o consumo dos açúcares presentes no mosto inicial pela levedura durante a fermentação. Esta foi determinada por leitura direta do equipamento Alcolyzer Beer - Anton Paar.

- **Extrato Real (°Plato)**

O extrato real consiste na concentração das substâncias dissolvidas na cerveja determinada em °P, desconsiderando a influência do álcool na aferição, quando esta desconsideração não é aplicada é chamado extrato aparente.

As medidas de extrato real foram realizadas pelo equipamento Alcolyzer Beer - Anton Paar, com seu resultado expresso em °P e corrigido de acordo com a temperatura.

4.5 Análise estatística

Para analisar os dados e comparar as médias, foram realizados os testes ANOVA e Tukey ($p < 0,05$), usando o software XLSTAT (2016).

Para correlacionar os parâmetros avaliados, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson (ρ) utilizando o software Microsoft Excel (Microsoft 2010®). Para fins de classificação, as seguintes faixas foram utilizadas: baixa correlação $0,000 \leq r \leq 0,200$, alta correlação $0,601 \leq r \leq 0,800$ e muito alta correlação $0,801 \leq r \leq 1,000$ (CHRISTMANN e BADGETT, 2009)

5. Resultados e Discussão

5.1 Variação de Unidades de Amargor ao longo da fermentação e maturação

A variação da medida de Unidades de Amargor ao longo do processo de fermentação e maturação de cada levedura e concentração inicial de inoculação pode ser observada na Tabela 3. As amostras partiram de um mosto com 82,1 BU. Os dados apresentados para o dia 1 são referentes a 24 horas após a inoculação do mosto.

Tabela 3. Médias de Unidades de Amargor durante fermentação e maturação à diferentes concentrações de inóculo comparadas utilizando Teste de Tukey.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C5
1	53,4 ±1,5 ^{cA}	74,0 ±1,8 ^{aA}	73,7 ±2,8 ^{aA}	61,3 ±2,6 ^{bcA}	72,5 ±3,9 ^{aA}	76,0 ±2,8 ^{aA}	61,2 ±10,8 ^{bcA}	69,1 ±4,5 ^{abA}	74,9 ±0,8 ^{aA}
2	37,7 ±3,3 ^{eCD}	56,4 ±1,1 ^{bB}	64,0 ±2,5 ^{aB}	43,3 ±1,4 ^{dC}	57,1 ±2,4 ^{bB}	64,0 ±2,8 ^{aB}	35,1 ±1,0 ^{eCD}	51,3 ±2,7 ^{cBC}	61,7 ±1,5 ^{aB}
3	36,2 ±1,3 ^{efD}	40,8 ±1,8 ^{dE}	46,2 ±1,8 ^{bcCD}	39,8 ±1,9 ^{deC}	47,5 ±3,5 ^{bCD}	56,0 ±2,7 ^{aC}	34,2 ±3,8 ^{fCD}	43,1 ±1,6 ^{cdF}	42,6 ±2,4 ^{cdDE}
4	37,6 ±1,7 ^{deCD}	45,6 ±1,6 ^{abCD}	43,3 ±1,6 ^{bcD}	42,0 ±2,7 ^{bcdCD}	43,3 ±3,1 ^{bcD}	48,6 ±5,3 ^{aDE}	35,3 ±1,3 ^{eCD}	45,7 ±0,5 ^{abEF}	40,6 ±3,8 ^{cdE}
5	40,0 ±1,5 ^{eC}	44,8 ±1,8 ^{bcdD}	43,7 ±2,3 ^{cdD}	42,4 ±2,9 ^{deC}	48,9 ±1,4 ^{aC}	46,9 ±1,7 ^{abE}	36,0 ±1,8 ^{fCD}	46,4 ±1,6 ^{abcdI}	44,8 ±2,1 ^{bcdDE}
7	43,7 ±2,7 ^{cB}	44,7 ±4,9 ^{bcDE}	49,5 ±1,2 ^{abcC}	52,3 ±2,3 ^{aB}	50,9 ±3,9 ^{abC}	49,4 ±5,7 ^{abcCDE}	43,6 ±2,9 ^{cB}	54,0 ±1,2 ^{aB}	49,4 ±4,0 ^{abcC}
9	39,2 ±1,7 ^{eCD}	45,4 ±1,3 ^{cCD}	47,1 ±1,9 ^{bcC}	42,2 ±1,7 ^{dC}	49,3 ±1,1 ^{abC}	50,5 ±1,7 ^{aCDE}	38,9 ±1,7 ^{eBC}	46,9 ±2,0 ^{bcCDI}	47,2 ±2,5 ^{bcCD}
11	40,2 ±2,3 ^{fBC}	49,2 ±1,7 ^{bcdC}	49,8 ±1,5 ^{bcC}	43,5 ±1,5 ^{eC}	51,9 ±0,9 ^{abC}	53,3 ±2,0 ^{aCD}	39,1 ±2,3 ^{fBC}	48,5 ±1,5 ^{cdCDI}	46,1 ±1,3 ^{deCD}
14	37,1 ±2,1 ^{cCD}	47,5 ±1,5 ^{aCD}	46,1 ±2,5 ^{abCD}	41,6 ±2,8 ^{bcC}	49,6 ±3,8 ^{aC}	46,5 ±3,8 ^{abE}	40,8 ±3,4 ^{bcBC}	50,4 ±1,3 ^{aBCD}	47,9 ±4,6 ^{aCD}
23	23,9 ±2,8 ^{cE}	36,0 ±1,9 ^{aF}	37,7 ±3,1 ^{aE}	36,1 ±3,2 ^{aD}	38,7 ±1,0 ^{aE}	37,9 ±5,0 ^{abF}	30,4 ±1,7 ^{bD}	38,5 ±4,3 ^{aG}	34,2 ±2,8 ^{abF}

As médias de uma mesma linha codificadas com letras minúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. As médias de uma mesma coluna codificadas com letras maiúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura US-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inóculo 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^{°P}.

Ao analisarmos os resultados da levedura A verificamos que logo no primeiro dia de fermentação há uma redução para as três diferentes concentrações de inóculo na medida de Unidades de Amargor. Para a amostra A7, inoculada a uma concentração de 10^7 cél./mL^ºP a queda é maior e difere das A6 e A5 ao nível de 5% de significância. No segundo dia de fermentação atinge o valor de $37,7 \pm 3,3$ BU e se mantém neste patamar, variando até $43,7 \pm 2,7$ durante o processo, mas chega ao último dia de fermentação, dia 14, ao valor de $37,1 \pm 2,1$. Após o processo de maturação, dia 23, pode-se observar uma nova queda no valor de unidades de amargor, atingindo $23,9 \pm 2,8$ BU.

Foi possível identificar este mesmo perfil de comportamento nas concentrações de inóculo 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP (A6 e A5), porém a queda da unidades de amargor ocorre de forma mais intensa entre os dias 2 e 3. Na concentração de 10^6 cél./mL^ºP (A6), o patamar de unidades de amargor durante a fermentação é atingindo no terceiro dia de fermentação, $40,8 \pm 1,8$ BU, chegando ao final do processo a um valor de $47,5 \pm 1,5$ BU e após a maturação houve uma nova queda para $36,0 \pm 1,9$ BU. O valor apresentado no terceiro dia de fermentação é o mais baixo, porém nos dias subsequentes apresenta um aumento. Entre todas as amostras o valor mais baixo ocorre entre os dias 3 e 5 da fermentação, podemos relacionar o aumento nos dias subsequentes à uma maior solubilidade dos iso- α -ácidos na presença de álcool e também à menor intensidade da fermentação nestes dias com menor formação de espuma. Não foram encontrados estudos que avaliam a perda de dos compostos de amargor ao longo da fermentação, porém de acordo com os dados apontados Laws et al. (1972), há atribuição destes fatores tanto à perda como à maior retenção dos iso- α -ácidos.

Com relação à concentração de inóculo de 10^5 cél./mL^ºP, podemos observar que os valores diferem ao nível de 5% de significância da amostra de 10^6 apenas no segundo e terceiro dia de fermentação. A medida do dia 3 da amostra A6 apresenta o menor valor. E já a partir do dia 4 o valor atingiu seu patamar de $46,2 \pm 1,8$. Após a maturação o valor de unidades de amargor de A5 foi de $37,7 \pm 3,1$, o qual não difere ao nível de 5% de significância da amostra A6.

A levedura B também apresentou uma queda no valor de unidades de amargor logo no primeiro dia de fermentação. Novamente, a amostra inoculada na concentração de 10^7 cél./mL^ºP já apresentou uma maior redução da medida, e

diferiu das amostras B6 e B5 ao nível de 5% de significância. A amostra B7 atingiu um patamar nas unidades de amargor logo no segundo dia de fermentação ($43,3 \pm 1,4$ BU) e chegou ao último dia de fermentação com um valor de $41,6 \pm 2,8$ BU. No dia 7 atingiu um valor de $52,3 \pm 2,3$ BU, podemos relacionar este aumento novamente à uma maior solubilidade dos iso- α -ácidos na presença de álcool e também à menor intensidade da fermentação nestes dias com menor formação de espuma. Após a maturação, a amostra B7 teve uma nova redução da medida de unidades de amargor para $36,1 \pm 3,2$.

Para as amostras B6 e B5 a queda da medida também se apresentou de forma mais gradual, assim como observado nas amostras da levedura A, também inoculadas à concentração de 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP. A levedura B à concentração de 10^6 atingiu um no quarto dia de fermentação o menor valor ($43,3 \pm 3,1$ BU). A partir do quinto dia atingiu o valor de $48,9 \pm 1,4$ BU e se manteve nesta faixa até o último dia de fermentação, dia 14. Após a maturação ocorreu uma nova queda nas unidades de amargor, chegando-se ao valor de $38,7 \pm 1,0$.

Ao analisarmos a amostra B5, inoculada à concentração de 10^5 cél./mL^ºP pode-se observar uma redução das medidas de unidades de amargor ainda mais gradual que as amostras inoculadas à 10^7 e 10^6 cél./mL^ºP. A amostra B5 apresenta reduções de unidades de amargor até o quinto dia de fermentação. Em seguida, houve uma elevação que se manteve até o dia 11 para posterior queda no dia 14 quando apresenta nova queda atingindo um valor de $46,5 \pm 3,8$. Após a maturação pode-se observar uma redução na medida, comportamento também observado nas demais amostras, atingindo um valor de $37,9 \pm 5,0$ UA.

A levedura C também apresentou uma queda de unidades de amargor logo no primeiro dia, sendo que a amostra C7 inoculada à concentração de 10^7 cél./mL^ºP teve uma maior redução frente as amostra C6 e C5 inoculadas à concentração de 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP, respectivamente, e difere ao nível de 5% de significância. Logo, no segundo dia de fermentação a amostra C7 atinge um patamar para medida de unidades de amargor ao longo do período de fermentação. Porém apresenta valores mais baixos entre os dias 2 e 4. Já nos dias subsequentes obtivemos valores maiores, fechando a fermentação no dia 14 com valor de $40,8 \pm 3,4$ BU. Após a maturação, dia 23, o valor para unidades de amargor reduziu para $30,4 \pm 1,7$.

A amostra C6 apresenta comportamento semelhante à amostra C7, logo no segundo dia atingiu um patamar de unidades de amargor que se manteve até o final

do período de fermentação. No dia 2, atingiu um valor de $51,3 \pm 2,7$ unidades de amargor, apesar de nos dias seguintes apresentar valores mais baixos. Nos últimos dias de fermentação os valores obtidos continuaram no mesmo patamar, fechando a fermentação no dia 14 com valor de $50,4 \pm 1,3$. Após a maturação também foi possível verificar uma nova queda medida para $38,5 \pm 4,3$.

A levedura C à concentração de 10^5 apresenta quedas no valor de unidades de amargor até o quarto dia de fermentação, no quinto dia houve um aumento da medida atingindo um patamar que se manteve até o dia 14, último dia de fermentação. No dia 4 atinge o valor de $40,6 \pm 3,8$ BU e ao final da fermentação $47,9 \pm 4,6$ BU. Assim como em todos os casos anteriores é possível observar uma redução na medida após a maturação, dia 23, atingindo o valor de $34,2 \pm 2,8$ BU.

De acordo com os dados apresentados foi possível verificar que durante a fermentação houve uma maior queda nas unidades de amargor para as amostras inoculadas à concentração de 10^7 cél./mL^ºP. As amostras A7, B7 e C7 não apresentaram diferença ao nível de 5% de significância, sendo assim não houve variação para este resultado entre as cepas de leveduras estudadas para esta concentração de inóculo.

Ao analisarmos as demais concentrações (10^6 e 10^5 cél./mL^ºP) podemos verificar, que dentre as três cepas de levedura estudadas não houve diferença ao nível de 5% de significância (A6, A5, B6, B5, C6 e C7).

Outro ponto a se destacar é que não houve diferença ao nível de 5% de significância entre as amostras A5, B7, B5 e C7, que possuem concentrações de inóculo de 10^7 e 10^5 cél./mL^ºP. Podemos observar que apesar de não haver uma diferença significativa entre os resultados obtidos das concentrações de 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP, as amostras inoculadas a 10^5 possuem valores mais baixos e não diferem dos valores obtidos por amostras inoculadas a 10^7 , que apresentaram os valores mais baixos para unidades de amargor. Sendo assim, é possível verificar que a redução das unidades de amargor das amostras inoculadas a 10^5 é maior que das a 10^6 , porém inferior aos resultados obtidos das amostras a 10^7 cél./mL^ºP.

Diante dos dados obtidos pós maturação, período em que as amostras ficaram armazenadas à 0°C durante 10 dias, podemos verificar que a amostra A7 atingiu o menor valor de unidades de amargor dentre todas as outras, frente ao valor do mosto original apresentou uma redução de 70%. A amostra C7 foi a segunda em redução, atingindo um valor 62% abaixo da medida do mosto original. As demais

amostras ficaram na faixa de 55% de redução e não obtiveram diferença ao nível de 5% de significância entre si. Vale salientar que as amostras B5 e C5 não tiveram diferença significativa (5%) frente a amostra C7, novamente mostrando uma tendência de maior redução das unidades de amargor para amostras inoculadas na concentração de 10^5 do que as inoculadas a 10^6 cél./mL^ºP. Já a amostra B7, que ao final do processo de fermentação apresentava valor não diferente da amostra C7 (ao nível de 5% de significância) obteve uma redução menor que as demais amostras durante a maturação, resultando em um valor que não difere das amostras inoculadas na concentração de 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP.

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que os primeiros dias de fermentação e o processo de maturação tiveram grande impacto na redução das unidades de amargor para todas as amostras. Na Tabela 4 são apresentados os valores das reduções de amargor ao longo dos dias analisados, partindo de um mosto com 82,1 BU. As células marcadas em vermelho representam os dias de maior redução frente ao dia anterior.

Tabela 4. Variação entre as médias das unidades de amargor frente ao dia anterior.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C5
1	-26,6	-6,0	-6,3	-18,7	-7,5	-4,0	-18,8	-10,9	-5,1
2	-15,7	-17,5	-9,7	-18,0	-15,4	-12,0	-26,1	-17,8	-13,2
3	-1,5	-15,6	-17,8	-3,5	-9,6	-7,9	-0,9	-8,2	-19,1
4	1,4	4,8	-2,9	2,2	-4,2	-7,4	1,0	2,6	-2,0
5	2,4	-0,8	0,4	0,4	5,6	-1,7	0,8	0,7	4,2
7	3,8	0,0	5,9	10,0	2,0	2,5	7,6	7,5	4,6
9	-4,6	0,7	-2,4	-10,1	-1,7	1,1	-4,7	-7,1	-2,2
11	1,1	3,7	2,7	1,3	2,6	2,8	0,2	1,5	-1,1
14	-3,1	-1,7	-3,7	-2,0	-2,4	-6,8	1,7	2,0	1,7
23	-13,2	-11,5	-8,4	-5,4	-10,9	-8,5	-10,4	-12,0	-13,6

A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura US-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inóculo 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP.

De acordo com a Tabela 4 pode-se observar que as amostras inoculadas as concentrações de 10^7 cel./mL tiveram maior queda logo no primeiro ou segundo dia

de fermentação, sendo o dia 1 para a amostra A7, os dias 1 e 2 para a amostra B7 e o dia 2 para a amostra C7. Já com relação as amostras inoculadas na concentração de 10^6 e 10^5 os dias de maior queda foram entre os dias 2 e 3.

Nas Tabelas 5 e 6 podemos verificar que o processo de fermentação foi responsável por pela maior parcela da redução das unidades de amargor, em torno de 77% dentre as amostras observadas. Já a maturação representou uma contribuição de 23% na redução.

Tabela 5. Redução das unidades de amargor durante a fermentação e porcentagem de perda frente a redução total dos processos de fermentação e maturação.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C5
Fermentação	-42,9	-32,5	-33,9	-38,5	-30,4	-33,5	-39,2	-29,6	-32,1
% perda	76%	74%	80%	88%	74%	80%	79%	71%	70%

A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura US-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inóculo 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^{ºP}.

Tabela 6. Redução das unidades de amargor durante a maturação à 0°C e porcentagem de perda frente a redução total dos processos de fermentação e maturação.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C5
Maturação	-13,2	-11,5	-8,4	-5,4	-10,9	-8,5	-10,4	-12,0	-13,6
% perda	24%	26%	20%	12%	26%	20%	21%	29%	30%

A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura US-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inóculo 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^{ºP}.

Para a levedura A (Fermentis – Safale – US-05) houve maior perda dos compostos de amargor para a concentração de 10^7 cél./mL^{ºP}, cerca de 54,8% ao final da fermentação, chegando a 70% de perda após a maturação. Enquanto que para as concentrações de 10^6 e 10^5 cél./mL^{ºP} não houve diferença (46,8% na fermentação e 36,8% na maturação).

Para a levedura B (Fermentis – Safale – S-04) ao término da fermentação houve diferenciação apenas entre as amostras inoculadas a 10^7 e 10^6 cél./mL^ºP, com uma perda respectiva de 49,4% e 39,6%. Após a maturação não houve diferença significativa entre as três inoculações testadas.

Quanto à levedura C (Mangrove – M44 – US West Coast), as amostras inoculadas a 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP não apresentaram diferença significativa ao final da fermentação.

As perdas apontadas neste estudo são semelhantes ao maior valor verificado por Laws et al. (1972), em que os valores variaram entre 23, 32 e 47% de perda dos compostos de iso- α -ácidos durante a fermentação. A maior perda neste estudo ocorre no mosto de maior densidade específica dentre os avaliados, 1,050 g/cm³(12ºP), semelhante a densidade utilizada neste estudo. Laws et al. (1972) relacionam esta perda maior à maior atividade das leveduras durante a fermentação, na qual houve maior perda de compostos pela formação de espuma e maior adsorção pelo fermento e espuma. Podemos relacionar esta maior atividade às fermentações que ocorreram com maior concentração de inóculo e tiveram maior redução nas unidades de amargor.

Conforme relatado por Boulton e Quain, 2001 durante a maturação há decantação das células de levedura e de outros compostos. Desta forma, esperava-se uma redução das unidades de amargor após a maturação, já que há uma associação destes compostos à parede celular das leveduras.

5.2 Variação da contagem de células ao longo da fermentação e maturação

A variação da contagem de células ao longo do processo de fermentação e maturação de cada levedura e concentração inicial de inóculo pode ser observada nos gráficos apresentados a seguir (Figuras 7, 8 e 9). O dia 1 representa a coleta para análise após 24 horas à inoculação do fermento.

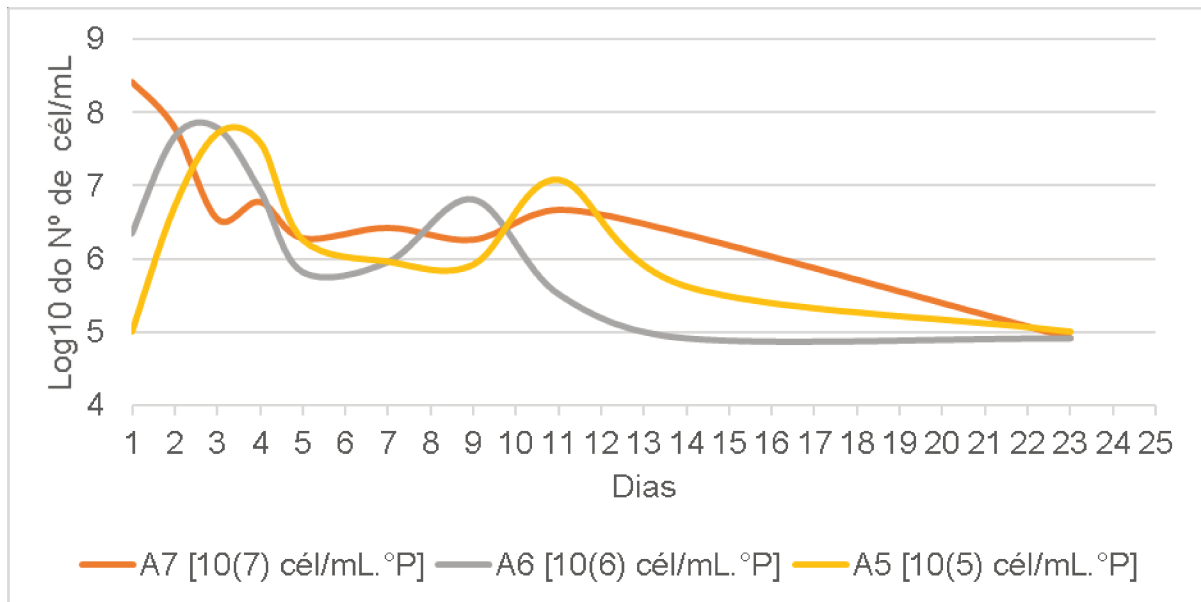


Figura 7. Contagem de células em suspensão durante o processo de fermentação e maturação da levedura A inoculadas inicialmente à 107, 106 e 105 cél./mL^{°P} (amostras A7, A6 e A5, respectivamente).

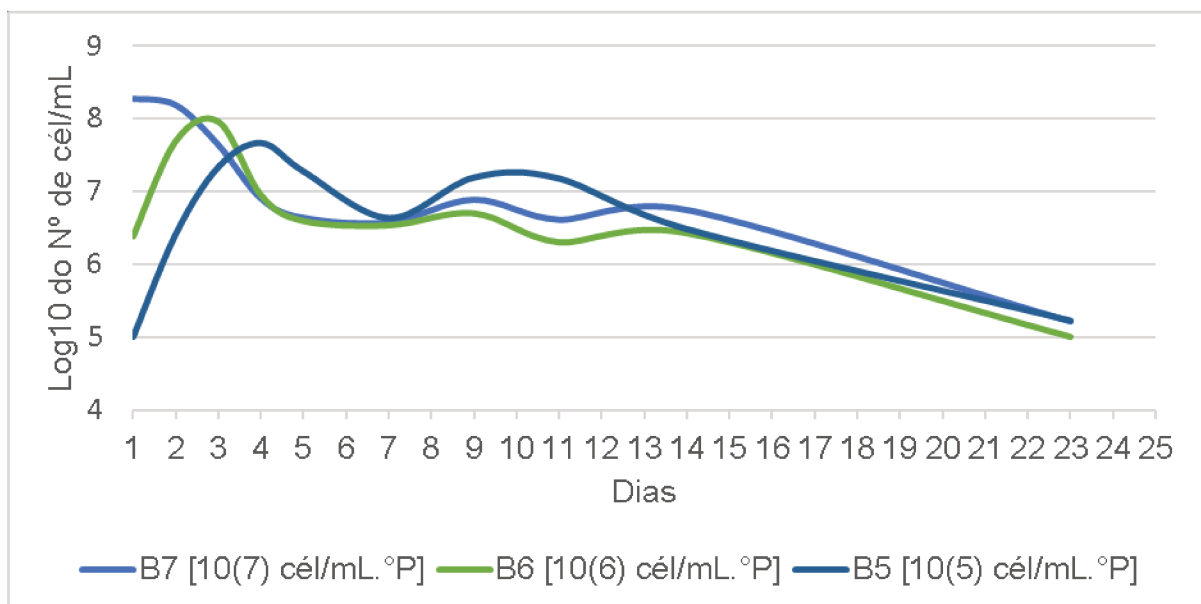


Figura 8. Contagem de células em suspensão durante o processo de fermentação e maturação da levedura B inoculadas inicialmente à 107, 106 e 105 cél./mL^{°P} (amostras B7, B6 e B5, respectivamente).

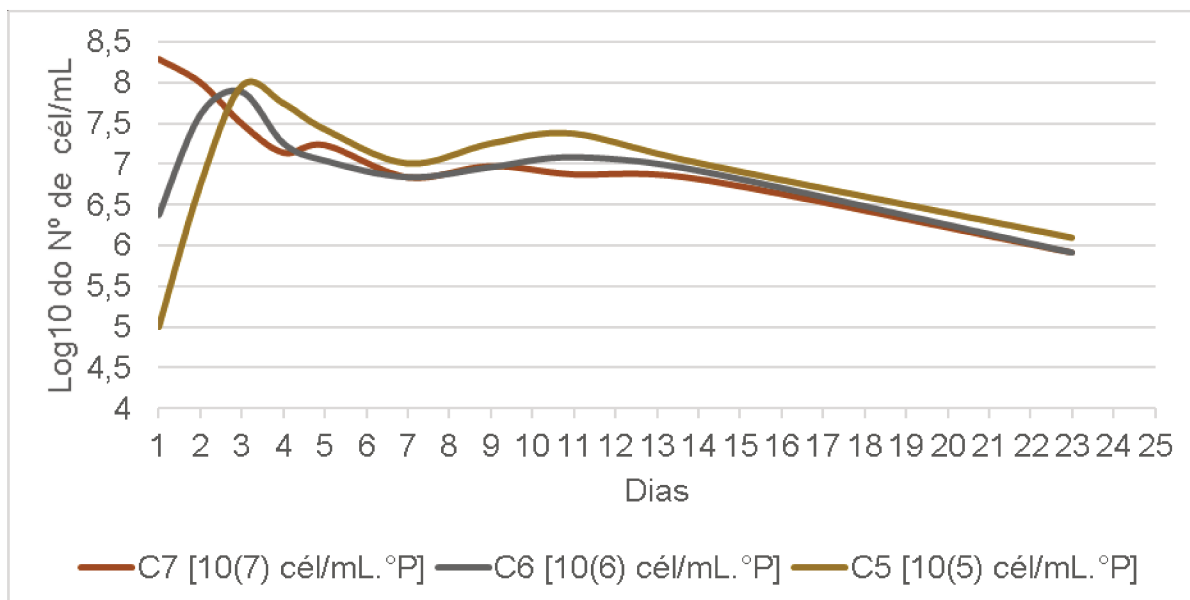


Figura 9. Contagem de células em suspensão durante o processo de fermentação e maturação da levedura C inoculadas inicialmente à 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^oP (amostras C7, C6 e C5, respectivamente).

Logo no primeiro dia de fermentação é possível notar a diferença significativa nas amostras inoculadas na concentração 10^7 cél./mL^oP frente às demais concentrações de inóculo. Como esperado e também verificado por VERBELEN et al. (2009), a contagem de células em suspensão é substancialmente maior para maiores concentrações de inóculo, sendo que a amostra A7 apresentou o maior valor. Já no segundo dia houve uma queda no valor para as três leveduras em estudo, porém a queda foi maior para a amostra A7, atingindo valor de $61,7 \pm 2,3 \times 10^6$ cel./mL, enquanto que para a amostra B7 a contagem de células em suspensão ainda foi elevada, $156,0 \pm 6,0 \times 10^6$ cel./mL e para amostra C7 uma queda mais branda foi apresentada, $99,3 \pm 13,6 \times 10^6$ cel./mL. No terceiro dia de fermentação a amostra A7 apresentou nova queda significativa para o valor $3,5 \pm 1,8 \times 10^6$ cel./mL e se manteve neste patamar até o final da fermentação, dia 14. Já para a amostra da levedura B inoculada à concentração de 10^7 cél./mL^oP temos a primeira queda significativa na contagem de células em suspensão no dia 3, atingindo um valor de $44,2 \pm 15,8 \times 10^6$ cel./mL. Esta atingiu um patamar de $8,1 \pm 2,2 \times 10^6$ cel./mL no quarto dia de fermentação que se manteve até o dia 14. O mesmo ocorreu para a amostra C7 que apresentou uma queda no terceiro e quarto dia, atingindo um patamar que se manteve até o final da fermentação, quando atingiu um valor de $6,6 \pm 4,4 \times 10^6$ cel./mL.

Para as amostras inoculadas a 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP o pico de contagem de células em suspensão ocorreu no terceiro dia de fermentação, entre $92,6 \pm 5,9 \times 10^6$ e $52,9 \pm 8,0 \times 10^6$ cel./mL. Logo é possível notar o aumento da contagem do dia 1 ao dia 3, com exceção da amostra B5 que atingiu o pico no quarto dia do processo fermentativo, um valor de $45,4 \pm 1,6 \times 10^6$ cel./mL. As amostras A6, A5 e C6 não apresentaram diferença ao nível de 5% de significância, assim como ocorreu entre as amostras B6, C6 e C5.

No quarto dia de fermentação as amostras inoculadas na concentração de 10^6 cél./mL^ºP atingiram um patamar na contagem de células e não diferiram entre si ao nível de 5% de significância. Enquanto que para as amostras inoculadas a 10^5 cél./mL^ºP o patamar foi atingido no quinto dia.

Com relação a etapa de maturação foi possível observar uma nova queda na contagem de células em suspensão para todas as amostras, de tal forma que não houve diferença ao nível de 5% de significância entre elas.

De acordo com Boulton e Quain, 2001, a contagem de células em suspensão atingiu o seu valor máximo aproximadamente após 100 horas do início da fermentação, para depois decair com a desaceleração da taxa de fermentação. Podemos verificar este comportamento apenas nas amostras inoculadas nas concentrações de 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP.

Ao compararmos os dados obtidos da contagem de células em suspensão à perda das unidades de amargor, é possível notar nas amostras inoculadas nas concentrações de 10^6 e 10^5 cél./mL^ºP que ao aumentar a contagem de células a cada dia também há um aumento na queda da medida de BU. Este fato ocorre entre o primeiro e o terceiro dia de fermentação. Já para as amostras inoculadas à 10^7 cél./mL^ºP a queda de BU cessa logo no segundo dia de fermentação, quando também é possível notar uma queda na contagem de células, conforme observado na Figura 10.

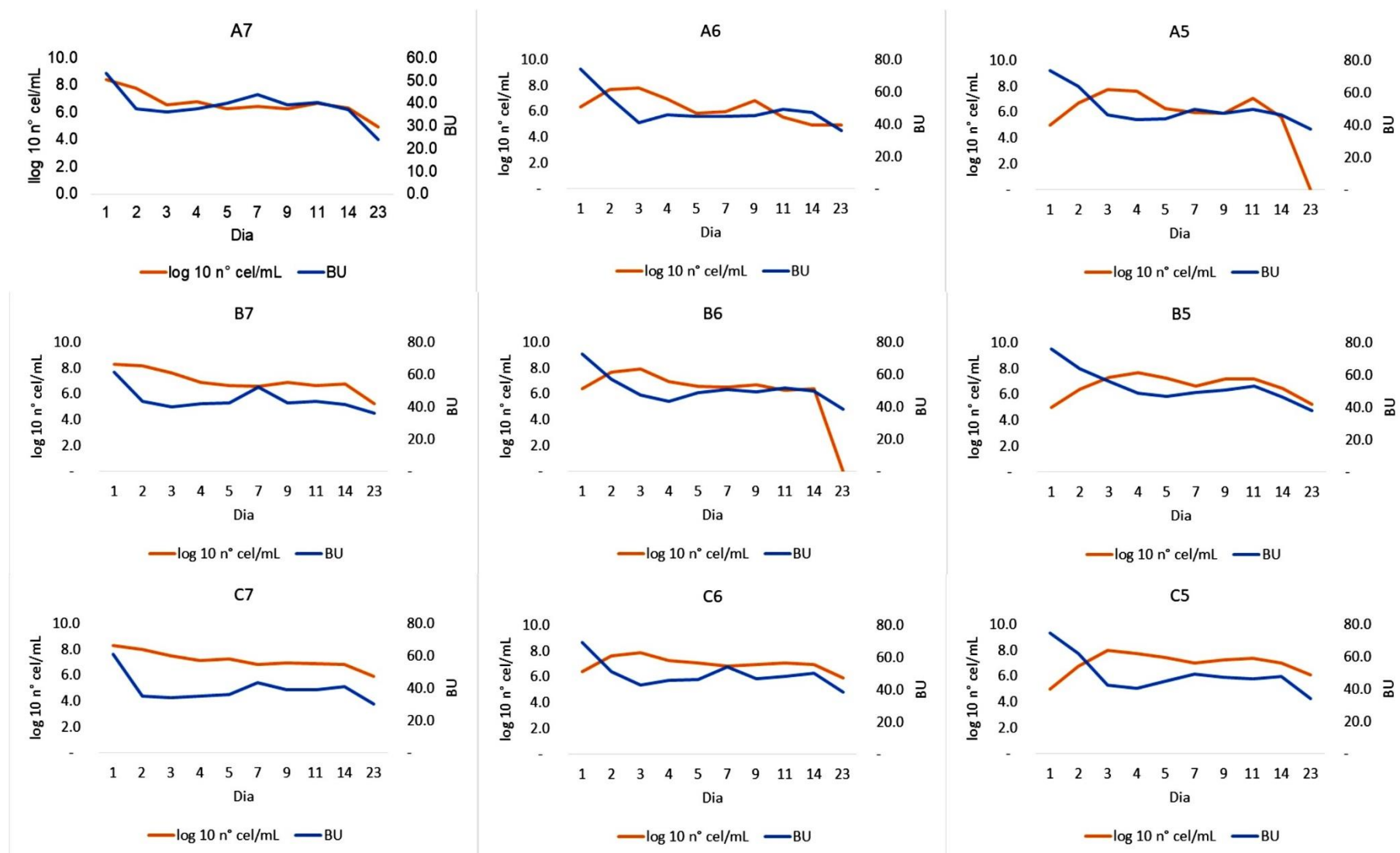


Figura 10. Contagem de células versus BU ao longo da fermentação e após a maturação

Outro ponto que chama a atenção é com relação aos picos na contagem de células em suspensão, que são menores para as amostras inoculadas a 10^6 e 10^5 cél./mL^{ºP}, variando entre 92 e 45,4 cél. 10^6 /mL. Enquanto que para as amostras inoculadas à 10^7 cél./mL^{ºP} os picos variaram entre 258,3 e 191,7 cél. 10^6 /mL. Resultados semelhantes foram obtidos por EDELEN et al. (1996) em que foram avaliadas quatro diferentes concentrações de inóculo 12,8; 30,3; 53,8 e 74,9 $\times 10^6$ cel/mL, em um mosto com por volta de 16^{ºP}. Neste estudo a maior concentração de inóculo apresentou um pico por volta de 145×10^6 cel/mL após aproximadamente 60 horas de fermentação. Já no presente estudo a maior concentração de inóculo utilizada 10^7 cél./mL^{ºP}, que corresponde a 119×10^6 cel/mL, apresentou picos entre 258,3 e $191,7 \times 10^6$ cel/mL.

Edelen et al. (1996) também avaliou o impacto das diferentes concentrações de inóculo na medida de BU. Neste estudo, os resultados de unidades de amargor mais baixos foram observados para as amostras inoculadas a uma maior concentração. Este resultado é atribuído a perdas para a parede celular das células de levedura, mais presentes em maiores concentrações de inóculo, e à maior formação de espuma devido a fermentação mais vigorosa. Na Tabela 7 são apresentados os resultados obtidos entre as diferentes concentrações de inóculo. Não foram mensuradas as perdas ao longo da fermentação.

Tabela 7. Medida de BU (*Bitterness Units*) em relação a concentração de inóculo.

Céls $\times 10^6$ /mL	BU
12,8	24,6
30,3	21,6
53,8	20,7
74,9	18,7

FONTE: EDELEN et al., 1996

Já VERBELEN et al.(2009) também realizaram a verificação do impacto da concentração de inóculo na medida de BU. Neste estudo foi utilizado um mosto à 15^{ºP} e as seguintes concentrações de inóculo: 10×10^6 cel/mL, 20×10^6 cel/mL, 40×10^6 cel/mL, 80×10^6 cel/mL e 120×10^6 cel/mL. Porém não foi observado uma diferença no resultado de BU para as diferentes concentrações conforme Tabela 8 abaixo.

Tabela 8. Medida de BU (*Bitterness Units*) em relação a concentração de inóculo.

Céls x10⁶/mL	BU
10	21,8±0,1
20	20,7±1,6
40	20,4±0,3
80	20,5±1,3
120	24,5±0,3

Fonte: VERBELEN et al., 2009.

No presente estudo podemos observar comportamento semelhante aos resultados obtidos por EDELEN et al. (1996). Ao final do processo de maturação pode-se verificar uma diferença na medida de BU para as amostras com maior concentração de inóculo.

Estudos indicam uma associação das substâncias do lúpulo, assim como os compostos de amargor, à parede celular das leveduras (LAWS et al., 1972; HOUGH e HUDSON, 1961; DIXON, 1967). Tanto que parte dos compostos de amargor perdidos durante a fermentação podem ser recuperados junto as leveduras (BOULTON E QUAIN, 2001 apud KIENINGER E DURNER, 1982). Sendo assim, podemos atribuir ao fato da maior queda de BU logo nos primeiros dias de fermentação ao aumento significativo da massa de levedura, principalmente nas amostras inoculadas a concentração de 10⁷ cél./mL^ºP.

5.3 Variação do pH ao longo da fermentação e maturação

A variação do pH ao longo do processo de fermentação e maturação de cada levedura e concentração inicial de inóculo pode ser observada na Tabela 9. A fermentação partiu de um pH inicial de 5,41.

Tabela 9. Médias do pH durante fermentação e maturação à diferentes concentrações de inóculo comparadas utilizando Teste de Tukey.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C5
1	4,41 ±0,03 ^{eA}	5,24 ±0,01 ^{cdA}	5,38 ±0,02 ^{aA}	4,46 ±0,09 ^{eA}	5,24 ±0,03 ^{bcdA}	5,36 ±0,02 ^{abA}	4,38 ±0,03 ^{eABC}	5,13 ±0,05 ^{dA}	5,32 ±0,06 ^{abcA}
2	4,21 ±0,03 ^{cd}	4,86 ±0,03 ^{bB}	5,34 ±0,08 ^{aA}	4,20 ±0,02 ^{dBCD}	4,91 ±0,02 ^{bB}	5,32 ±0,13 ^{aA}	4,43 ±0,08 ^{cA}	4,73 ±0,09 ^{bB}	5,23 ±0,14 ^{aA}
3	4,19 ±0,04 ^{gCDE}	4,43 ±0,03 ^{deDEF}	4,74 ±0,03 ^{bB}	4,10 ±0,02 ^{hD}	4,32 ±0,02 ^{fC}	4,91 ±0,03 ^{aB}	4,37 ±0,03 ^{efABC}	4,46 ±0,02 ^{dCD}	4,60 ±0,05 ^{cB}
4	4,15 ±0,02 ^{dCE}	4,43 ±0,02 ^{bDEF}	4,52 ±0,02 ^{aCD}	4,12 ±0,01 ^{dCD}	4,25 ±0,03 ^{cCD}	4,43 ±0,05 ^{bC}	4,40 ±0,03 ^{bABC}	4,44 ±0,01 ^{bCD}	4,43 ±0,02 ^{bC}
5	4,28 ±0,04 ^{efBC}	4,51 ±0,04 ^{abCD}	4,57 ±0,02 ^{aC}	4,21 ±0,02 ^{fBCD}	4,31 ±0,06 ^{de}	4,38 ±0,04 ^{cdCDE}	4,42 ±0,01 ^{bcAB}	4,50 ±0,04 ^{abC}	4,46 ±0,01 ^{bcBC}
7	4,26 ±0,03 ^{cdBCD}	4,47 ±0,00 ^{aCDE}	4,51 ±0,01 ^{aCD}	4,20 ±0,05 ^{dBCD}	4,32 ±0,04 ^{cCD}	4,36 ±0,02 ^{bcCDE}	4,44 ±0,02 ^{abA}	4,45 ±0,06 ^{abCD}	4,41 ±0,04 ^{abC}
9	4,18 ±0,01 ^{deDE}	4,40 ±0,04 ^{aE}	4,43 ±0,02 ^{aD}	4,15 ±0,03 ^{eCD}	4,25 ±0,04 ^{cdCD}	4,29 ±0,02 ^{bcDE}	4,31 ±0,03 ^{bcC}	4,36 ±0,01 ^{abD}	4,36 ±0,02 ^{abC}
11	4,21 ±0,06 ^{fCDE}	4,44 ±0,03 ^{abDEF}	4,49 ±0,01 ^{aCD}	4,23 ±0,03 ^{efBC}	4,31 ±0,03 ^{deC}	4,32 ±0,03 ^{cdeCDE}	4,38 ±0,01 ^{bcdABC}	4,45 ±0,02 ^{abCD}	4,41 ±0,04 ^{abcC}
14	4,31 ±0,02 ^{deAB}	4,55 ±0,04 ^{aC}	4,50 ±0,04 ^{abCD}	4,28 ±0,03 ^{eB}	4,32 ±0,06 ^{deC}	4,40 ±0,03 ^{cdCD}	4,40 ±0,02 ^{bcdABC}	4,45 ±0,04 ^{bcCD}	4,47 ±0,03 ^{abcBC}
23	4,20 ±0,03 ^{cCDE}	4,38 ±0,05 ^{abF}	4,41 ±0,11 ^{aD}	4,18 ±0,07 ^{cBCD}	4,19 ±0,01 ^{cCD}	4,25 ±0,02 ^{bcE}	4,33 ±0,03 ^{abcBC}	4,45 ±0,02 ^{aCD}	4,42 ±0,06 ^{aC}

As médias de uma mesma linha codificadas com letras minúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. As médias de uma mesma coluna codificadas com letras maiúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura S-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inóculo 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^{°P}.

Ao observarmos os dados apresentados é possível verificar que logo no primeiro dia de fermentação há uma queda no pH das amostras inoculadas à concentração de 10^7 cel./mL.°P e que diferem ao nível de 5% de significância das demais amostras.

Já no dia 2 há uma clara diferenciação do pH para cada concentração de inóculo, sendo que as amostras A5, B5 e C5 pouco alteraram frente ao dia anterior e não diferiram entre si ao nível de 5% de significância. Enquanto que para as amostras A6, B6 e C6 houve uma queda frente ao dia 1 e também não diferem entre si ao nível de 5% de significância. A amostra A7 não diferiu de B7 e C7, porém houve uma diferença significativa de 5% entre as amostras B7 e C7.

VERBELEN et al. (2009) também relata um pH final menor para mostos inoculados à maior concentração de cel./mL.°P. Esta queda durante a fermentação está relacionada a assimilação de aminoácidos e fosfatos pela levedura, assim como pela formação de ácidos orgânicos e CO₂ (BOULTON e QUAIN, 2001; COOTE e KIRSOP, 1976).

5.4 Variação do teor de álcool ao longo da fermentação e maturação

A variação do teor de álcool ao longo do processo de fermentação e maturação de cada levedura e concentração inicial de inóculo pode ser observada na Tabela 10.

Tabela 10. Médias do teor de álcool durante fermentação e maturação à diferentes concentrações de inóculo comparadas utilizando Teste de Tukey.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C5
1	1,43 ±0,14 ^{abcF}	0,19 ±0,14 ^{cH}	0,18 ±0,10 ^{cF}	2,11 ±0,05 ^{abC}	0,85 ±1,47 ^{bcC}	0,13 ±0,19 ^{cE}	2,54 ±0,31 ^{aD}	0,07 ±0,03 ^{cE}	0,00 ±0,03 ^{cD}
2	3,68 ±0,06 ^{aE}	0,73 ±0,01 ^{cG}	0,25 ±0,10 ^{deF}	3,71 ±0,20 ^{aB}	0,63 ±0,08 ^{cdC}	0,10 ±0,10 ^{eE}	4,10 ±0,08 ^{abC}	1,41 ±0,50 ^{bD}	0,18 ±0,05 ^{eD}
3	4,06 ±0,06 ^{bD}	2,75 ±0,09 ^{dF}	1,25 ±0,14 ^{fE}	4,52 ±0,01 ^{aA}	2,62 ±0,07 ^{dB}	0,44 ±0,01 ^{gE}	4,25 ±0,03 ^{abABC}	3,19 ±0,08 ^{cC}	2,17 ±0,04 ^{eC}
4	4,25 ±0,08 ^{abCD}	3,51 ±0,10 ^{cdE}	2,73 ±0,37 ^{eD}	4,54 ±0,12 ^{aA}	3,73 ±0,06 ^{cAB}	1,98 ±0,15 ^{fD}	4,31 ±0,08 ^{abAB}	3,94 ±0,08 ^{bcB}	3,05 ±0,21 ^{deB}
5	4,47 ±0,09 ^{aBC}	4,01 ±0,16 ^{cD}	3,53 ±0,14 ^{dC}	4,64 ±0,09 ^{aA}	4,11 ±0,00 ^{bcA}	3,27 ±0,08 ^{dC}	4,40 ±0,02 ^{abAB}	4,14 ±0,05 ^{bcAB}	4,04 ±0,18 ^{cA}
7	4,45 ±0,06 ^{abBC}	4,24 ±0,04 ^{cCD}	4,02 ±0,07 ^{deB}	4,65 ±0,04 ^{aA}	4,35 ±0,04 ^{bcA}	3,91 ±0,10 ^{eB}	4,40 ±0,08 ^{bcAB}	4,27 ±0,03 ^{bcAB}	4,25 ±0,05 ^{cdA}
9	4,55 ±0,10 ^{abB}	4,45 ±0,11 ^{abBC}	4,35 ±0,12 ^{bAB}	4,88 ±0,26 ^{aA}	4,70 ±0,14 ^{abA}	4,27 ±0,09 ^{bAB}	4,50 ±0,05 ^{abA}	4,49 ±0,28 ^{abA}	4,30 ±0,04 ^{bA}
11	4,61 ±0,05 ^{abAB}	4,54 ±0,04 ^{bcABC}	4,48 ±0,05 ^{cdA}	4,70 ±0,03 ^{aA}	4,62 ±0,03 ^{abA}	4,49 ±0,05 ^{cdAB}	4,53 ±0,02 ^{bcA}	4,44 ±0,02 ^{cdAB}	4,39 ±0,03 ^{dA}
14	4,67 ±0,06 ^{abAB}	4,61 ±0,08 ^{abcAB}	4,64 ±0,06 ^{abA}	4,72 ±0,03 ^{aA}	4,68 ±0,00 ^{abA}	4,62 ±0,02 ^{abcA}	4,58 ±0,01 ^{bcA}	4,51 ±0,03 ^{cdA}	4,46 ±0,02 ^{dA}
23	4,82 ±0,09 ^{aA}	4,79 ±0,08 ^{abA}	4,73 ±0,10 ^{abA}	4,61 ±0,35 ^{abA}	4,05 ±0,17 ^{abA}	4,15 ±0,53 ^{abcAB}	3,87 ±0,20 ^{bc}	4,03 ±0,31 ^{abAB}	4,05 ±0,60 ^{abA}

As médias de uma mesma linha codificadas com letras minúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. As médias de uma mesma coluna codificadas com letras maiúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura US-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inóculo 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^{°P}.

Segundo os dados apresentados na Tabela 10 é possível verificar que as amostras inoculadas a uma concentração de 10^7 cél./mL^ºP apresentaram um aumento rápido do teor alcoólico e se diferenciam das demais (ao nível de 5% de significância) logo no segundo dia de fermentação. Após este período a levedura C atingiu um patamar de teor de álcool acima de 4% (v/v). Já as amostras inoculadas a concentração de 10^6 cél./mL^ºP apresentaram uma elevação do teor de álcool mais rápida que as amostras inoculadas à 10^5 cél./mL^ºP. Porém ao final da fermentação todas as amostras apresentam teor alcoólico próximo a 4,5%(v/v).

Após a maturação não houve variação significativa (5%) frente ao último dia de fermentação para todas as amostras, exceto para a amostra C1 que apresentou uma queda no teor alcoólico.

A Figura 11 apresenta a correlação entre os dados de teor de álcool e BU para cada uma das condições estudadas. É possível verificar que para todos os casos, existe uma correlação negativa entre as duas análises (p entre -0,803 e -0,67), ou seja, quanto mais alto o teor de álcool das amostras, mais baixo o BU. Apesar desta relação, em estudo realizado por VERBELEN et al. (2009) não houve alteração nos valores de etanol com a queda de BU. Podemos relacionar o aumento do teor alcoólico à maior concentração de inóculo, que também afetou a maior queda de BU. Em estudo realizado por ERTEN et al. (2007) foi verificado o aumento da concentração de etanol com aumento da concentração de inóculo, para uma concentração de 1×10^7 cél/mL obteve-se 6,46%(v/v) e para 1×10^8 cél/mL um valor de 6,83%(v/v). O'CONNOR-COX e INGLEDEW (1991) também relataram menores teores alcoólicos para mosto inoculados a menor concentração de células por mL e valores mais altos para as amostras inoculadas com maiores concentrações. Para o mosto inoculado a $1,6 \times 10^7$ cél/mL o teor de etanol foi de 6,13%(v/v), enquanto que para o mosto inoculado à 8×10^7 cél/mL o resultado foi de 7,63% (v/v).

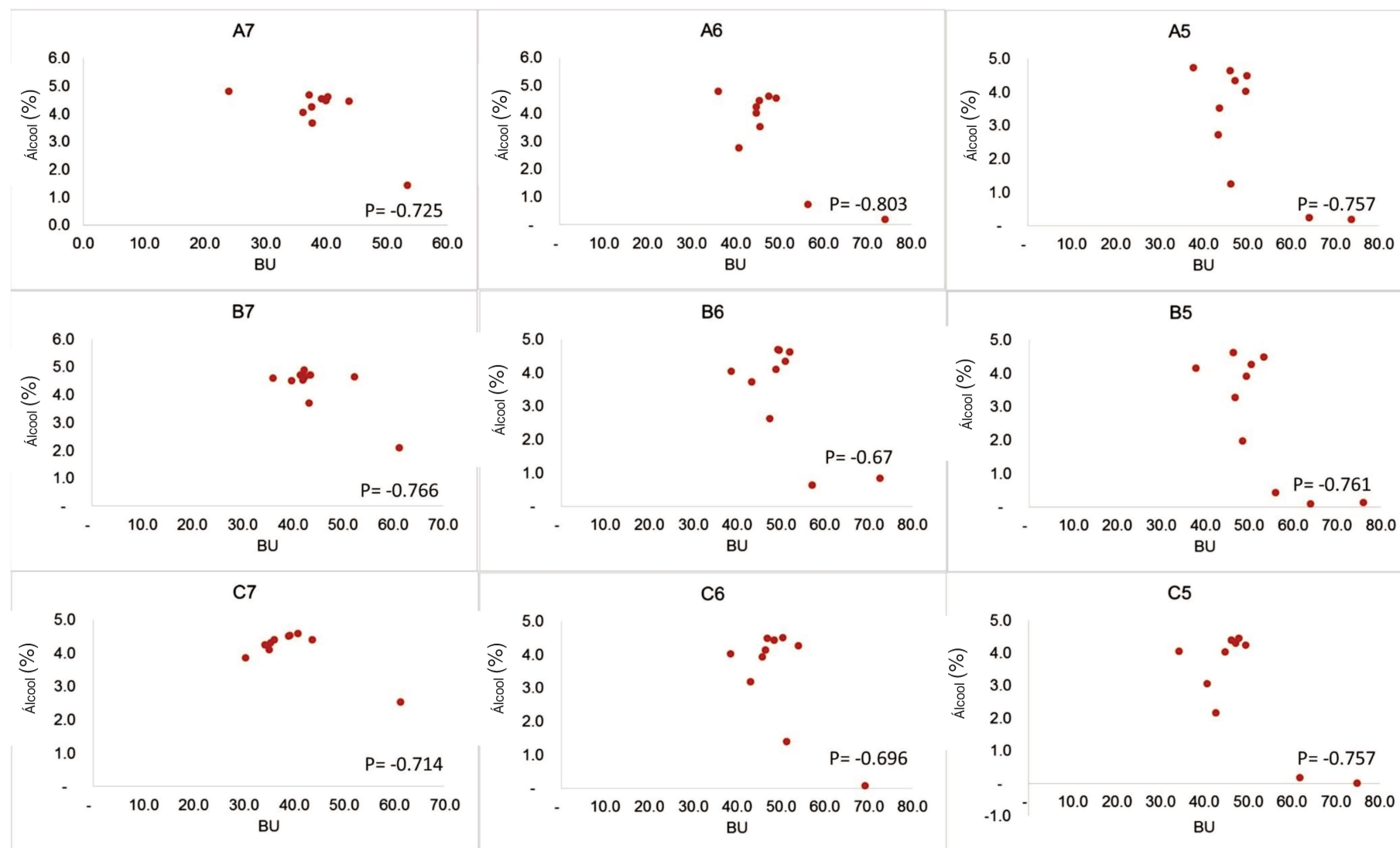


Figura 11. Correlações de teor de álcool e BU nas diferentes condições estudadas

5.5 Variação do Extrato Real (°P) ao longo da fermentação e maturação

A variação do extrato real (°P) ao longo do processo de fermentação e maturação de cada levedura e concentração de inóculo pode ser observada na Tabela 11. As amostras iniciaram o processo de fermentação com 11,8°P.

Tabela 11. Médias de extrato real (°P) durante fermentação e maturação à diferentes concentrações de inóculo comparadas utilizando Teste de Tukey.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C1
1	9,66 ±0,18 ^{bA}	11,62 ±0,19 ^{aA}	11,63 ±0,06 ^{aA}	9,03 ±0,55 ^{bA}	11,75 ±0,01 ^{aA}	11,65 ±0,30 ^{aA}	8,17 ±0,31 ^{cA}	11,62 ±0,12 ^{aA}	11,73 ±0,09 ^{aA}
2	6,14 ±0,02 ^{efB}	10,86 ±0,06 ^{cB}	11,57 ±0,01 ^{abA}	6,40 ±0,14 ^{eB}	11,03 ±0,07 ^{bcB}	11,68 ±0,14 ^{aA}	5,66 ±0,14 ^{fB}	8,22 ±0,57 ^{dB}	11,61 ±0,05 ^{aA}
3	5,59 ±0,02 ^{eC}	7,76 ±0,16 ^{cC}	7,59 ±0,25 ^{cBC}	5,23 ±0,14 ^{eC}	7,74 ±0,12 ^{cC}	11,26 ±0,08 ^{aA}	5,43 ±0,07 ^{eBC}	6,90 ±0,17 ^{dC}	8,41 ±0,06 ^{bB}
4	5,35 ±0,01 ^{fgCD}	6,54 ±0,12 ^{cdD}	7,70 ±0,35 ^{bB}	5,01 ±0,04 ^{gC}	6,16 ±0,01 ^{deD}	8,88 ±0,25 ^{aB}	5,37 ±0,08 ^{fgBC}	5,80 ±0,06 ^{efD}	7,11 ±0,51 ^{bcC}
5	5,23 ±0,06 ^{deDE}	6,18 ±0,31 ^{bcD}	6,66 ±0,28 ^{abCD}	5,03 ±0,06 ^{eC}	5,68 ±0,06 ^{cdE}	7,09 ±0,40 ^{aC}	5,33 ±0,07 ^{deBC}	5,54 ±0,04 ^{deDE}	5,56 ±0,27 ^{deD}
7	5,11 ±0,02 ^{cdDEF}	5,46 ±0,05 ^{bE}	5,83 ±0,16 ^{aDE}	4,98 ±0,02 ^{dCD}	5,25 ±0,03 ^{bcdF}	5,87 ±0,15 ^{aD}	5,29 ±0,07 ^{bcdBC}	5,34 ±0,02 ^{bcDE}	5,45 ±0,21 ^{bcdD}
9	5,07 ±0,08 ^{aEF}	5,31 ±0,14 ^{aEF}	5,48 ±0,02 ^{aEF}	5,24 ±0,26 ^{aC}	5,23 ±0,20 ^{aF}	5,34 ±0,12 ^{aDE}	5,32 ±0,03 ^{aBC}	5,42 ±0,34 ^{aDE}	5,23 ±0,15 ^{aD}
11	4,99 ±0,05 ^{aF}	5,10 ±0,04 ^{aEF}	4,82 ±0,57 ^{aFG}	4,98 ±0,00 ^{aC}	4,92 ±0,01 ^{aG}	5,05 ±0,07 ^{aE}	5,28 ±0,02 ^{aBC}	5,14 ±0,01 ^{aDE}	5,14 ±0,09 ^{aD}
14	3,33 ±0,07 ^{dG}	4,93 ±0,10 ^{bcF}	4,89 ±0,15 ^{bcFG}	4,98 ±0,03 ^{abcC}	4,89 ±0,00 ^{bcG}	4,79 ±0,09 ^{cE}	5,20 ±0,12 ^{aC}	5,05 ±0,03 ^{abE}	5,02 ±0,04 ^{abcD}
23	3,35 ±0,12 ^{aG}	4,35 ±0,18 ^{aG}	4,17 ±0,47 ^{aG}	4,32 ±0,22 ^{aD}	4,05 ±0,11 ^{aH}	3,87 ±0,21 ^{aF}	4,07 ±0,30 ^{aD}	4,25 ±0,50 ^{aF}	3,81 ±0,34 ^{aE}

As médias de uma mesma linha codificadas com letras minúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. As médias de uma mesma coluna codificadas com letras maiúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura S-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inoculação 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL°P.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 11 podemos observar uma maior queda nos resultados de extrato real logo nos primeiros dias de fermentação para todas as amostras. As amostras inoculadas a uma maior concentração cél./mL^ºP tiveram uma queda mais rápida nas medidas. Este comportamento também foi verificado em estudos semelhantes realizados por O'CONNOR-COX e INGLEDEW (1991), ERTEN et al. (2007) e VERBELEN et al. (2009).

Ao final da fermentação (dia 14) a amostra A7 apresentou o menor resultado para o extrato real dentre as amostras analisadas.

Após o término da maturação (dia 23) a maior parte das amostras apresentou uma queda na medida de extrato real, exceto as amostras A7 e A5.

A Figura 12 apresenta a correlação entre os dados de extrato real e BU para cada uma das condições estudadas. É possível verificar que para todos os casos, existe uma forte correlação positiva entre as duas análises (p entre 0,7958 e 0,9026), ou seja, quanto mais alto o extrato real, mais alto o BU. Conforme há a diminuição do extrato real, ocorre também redução do BU. Como a medida de extrato real é relacionada diretamente com o andamento da fermentação pelo consumo dos açúcares pela levedura, e observamos a queda de BU ao longo da fermentação era de se esperar uma correlação entre estas medidas.

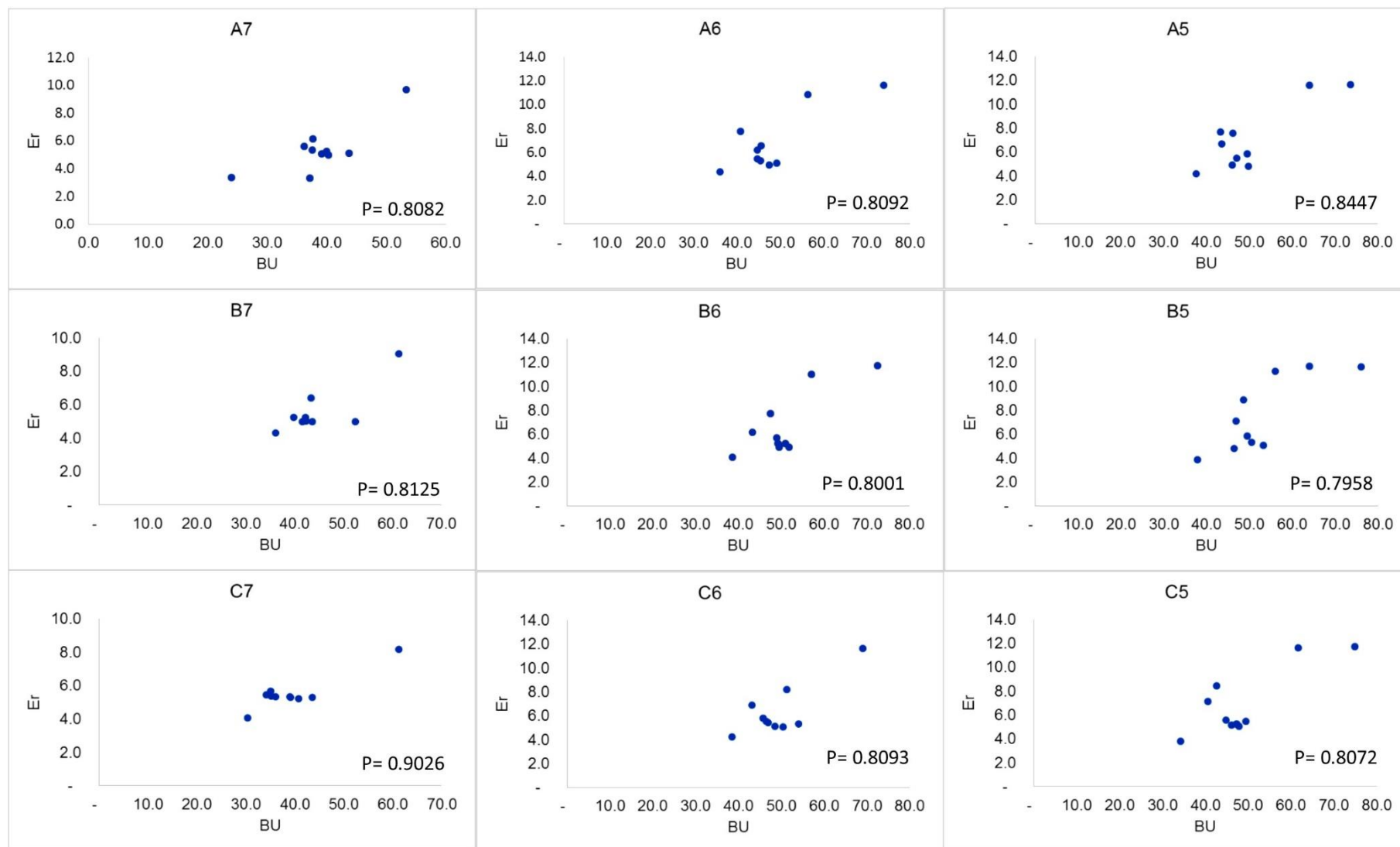


Figura 12. Correlações entre dados de extrato real e IBU nas diferentes condições estudadas.

5.6 Variação da taxa de atenuação ao longo da fermentação e maturação

A variação da taxa de atenuação ao longo do processo de fermentação e maturação de cada levedura e concentração de inóculo pode ser observada na Tabela 12. Como representa a porcentagem de açúcares consumidos pela levedura frente a quantidade inicial esta medida está relacionada diretamente com a medida de extrato real ao longo da fermentação. Ou seja, quanto maior a redução do extrato real ao longo da fermentação maior a taxa de atenuação. Esta medida é muito utilizada para verificar o desempenho de cepas de leveduras.

Para a levedura A (Fermentis – US05) segundo ficha técnica fornecida pelo laboratório produtor é esperado uma taxa de atenuação de 68%, já para a levedura B (Fermentis – S04) uma taxa de atenuação de 62%. Para a levedura C (Mangrove M44 West Coast) o fabricante não informa uma taxa de atenuação prevista, apenas classifica como alta.

Tabela 12. Médias da taxa de atenuação durante fermentação e maturação à diferentes concentrações de inóculo comparadas utilizando Teste de Tukey.

Dia	A7	A6	A5	B7	B6	B5	C7	C6	C5
1	18,89 ±1,82 ^{bE}	2,41 ±1,81 ^{cF}	2,33 ±1,32 ^{cF}	26,97 ±0,82 ^{aD}	0,00 ±0,00 ^{cl}	1,57 ±2,64 ^{cG}	31,73 ±2,84 ^{aE}	0,94 ±0,40 ^{cl}	0,08 ±0,13 ^{cF}
2	48,98 ±0,43 ^{bD}	9,50 ±0,16 ^{dE}	3,23 ±1,20 ^{eF}	47,30 ±0,71 ^{bc}	7,73 ±0,44 ^{bH}	1,34 ±1,34 ^{eG}	53,83 ±0,95 ^{aD}	24,90 ±0,64 ^{ch}	2,39 ±0,63 ^{eF}
3	53,82 ±0,37 ^{bc}	36,04 ±1,20 ^{dD}	21,38 ±1,44 ^{fE}	58,47 ±0,35 ^{aB}	35,06 ±0,94 ^{dG}	5,73 ±0,15 ^{gG}	55,75 ±0,47 ^{abCD}	42,49 ±1,20 ^{cG}	29,06 ±0,54 ^{eE}
4	56,14 ±0,52 ^{abBC}	46,21 ±1,17 ^{deC}	36,02 ±4,19 ^{fD}	59,41 ±0,79 ^{aB}	49,25 ±0,45 ^{cdF}	26,07 ±1,97 ^{gF}	56,40 ±0,53 ^{abBC}	52,16 ±0,78 ^{bcF}	40,69 ±3,45 ^{efD}
5	57,91 ±0,75 ^{abAB}	51,01 ±0,79 ^{dbc}	45,85 ±2,06 ^{eC}	59,80 ±0,18 ^{aB}	53,76 ±0,26 ^{cdE}	42,44 ±1,38 ^{eE}	57,06 ±0,37 ^{abcBC}	54,59 ±0,32 ^{bcE}	53,87 ±2,31 ^{cdC}
7	58,40 ±0,35 ^{abAB}	55,57 ±0,49 ^{cAB}	52,57 ±1,14 ^{dbc}	60,12 ±0,12 ^{aAB}	57,23 ±0,35 ^{bcD}	51,69 ±1,30 ^{dD}	57,25 ±0,15 ^{bcBC}	56,28 ±0,16 ^{cD}	56,32 ±0,21 ^{cBC}
9	59,17 ±0,18 ^{abA}	57,48 ±0,58 ^{bcA}	56,08 ±0,76 ^{cB}	60,03 ±0,14 ^{aB}	59,17 ±0,20 ^{abC}	56,32 ±1,10 ^{cC}	57,68 ±0,12 ^{bcBC}	57,16 ±0,06 ^{cCD}	56,99 ±0,95 ^{cBC}
11	59,82 ±0,29 ^{aA}	58,91 ±0,32 ^{aA}	60,07 ±2,73 ^{aAB}	60,38 ±0,15 ^{aAB}	60,24 ±0,08 ^{aBC}	58,90 ±0,64 ^{aBC}	57,99 ±0,11 ^{aBC}	58,18 ±0,10 ^{aBC}	57,91 ±0,59 ^{aB}
14	60,16 ±0,57 ^{aA}	60,15 ±0,57 ^{aA}	57,13 ±5,96 ^{aAB}	60,47 ±0,08 ^{aAB}	60,70 ±0,02 ^{aAB}	60,91 ±0,56 ^{aAB}	58,69 ±0,64 ^{aAB}	58,99 ±0,03 ^{aAB}	58,92 ±0,24 ^{aB}
23	59,64 ±0,21 ^{aA}	58,83 ±5,82 ^{aA}	64,77 ±3,10 ^{aA}	63,30 ±2,98 ^{aA}	61,78 ±0,36 ^{aA}	63,79 ±1,81 ^{aA}	60,57 ±0,59 ^{aA}	60,59 ±1,06 ^{aA}	63,14 ±1,56 ^{aA}

As médias de uma mesma linha codificadas com letras minúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. As médias de uma mesma coluna codificadas com letras maiúsculas iguais não diferem entre si a $p < 0,05$. A letra “A” representa a levedura US-05, a letra “B” representa a levedura S-04 e a letra “C” a levedura M44. Os números 7, 6 e 5 representam respectivamente as seguintes concentrações de inóculo 10^7 , 10^6 e 10^5 cél./mL^oP.

Assim como os demais parâmetros verificados há uma diferença significativa logo nos primeiros dias de fermentação entre as amostras inoculadas as concentrações de 10^7 cél./mL^oP frente as demais amostras inoculadas as concentrações de 10^6 e 10^5 . Ao final da fermentação (dia 14) não há diferença significativa entre todas as amostras, atingindo um grau de atenuação de por volta de 60%. O mesmo pode-se observar ao final da maturação. Ao compararmos os resultados obtidos verificamos uma atenuação final mais baixa para a levedura A que a fornecida pelo fabricante

A Figura 13 apresenta a correlação entre os dados de atenuação e BU para cada uma das condições estudadas. É possível verificar que para todos os casos, existe uma forte correlação negativa entre as duas análises (ρ entre -0,881 e -0,688), ou seja, quanto mais alta a atenuação, mais baixo o BU. Este resultado era esperado já que a taxa de atenuação é um indicativo da evolução da fermentação.

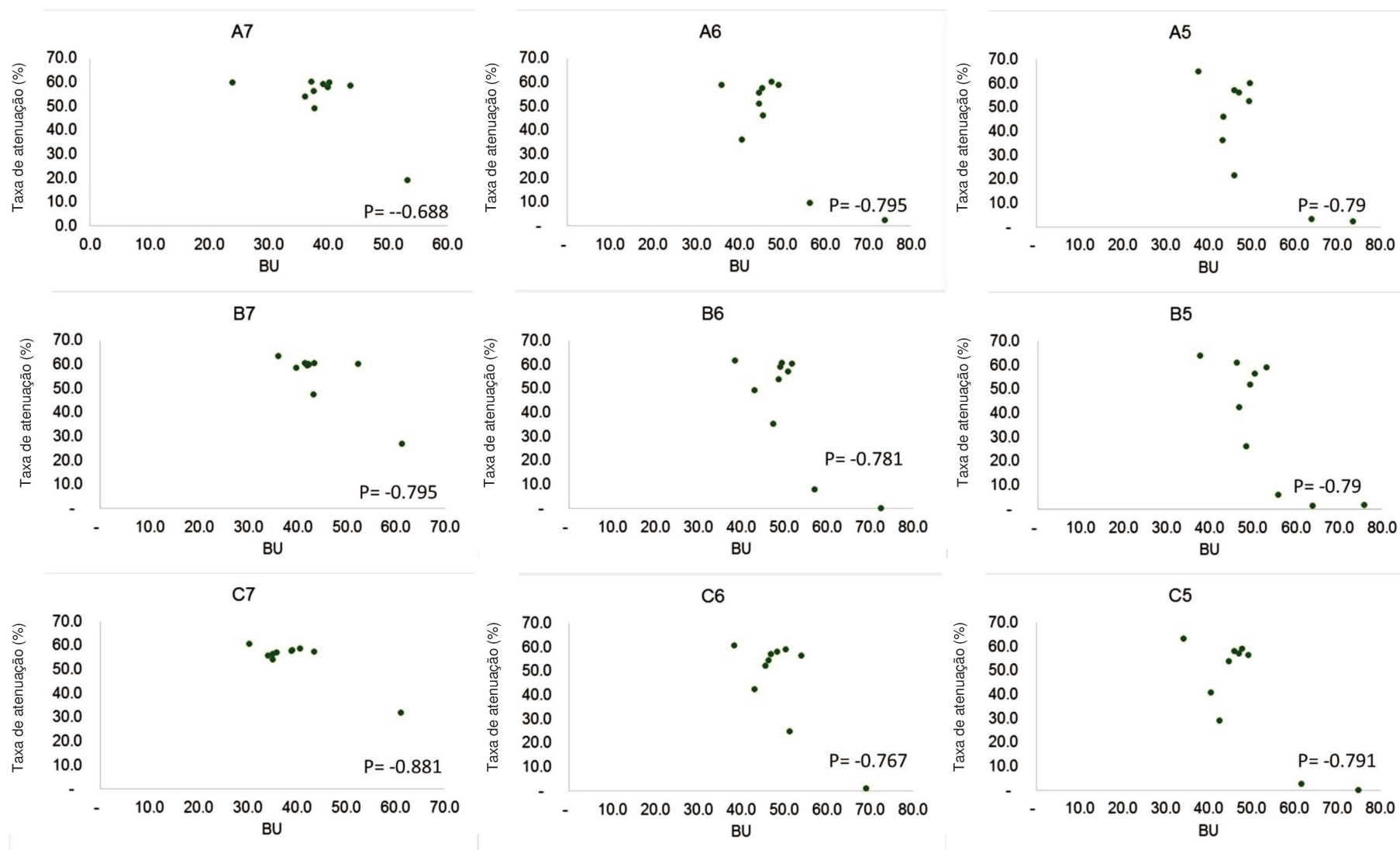


Figura 13. Correlações entre taxa de atenuação e BU para todas as condições estudadas.

5.7 Comparação dos resultados obtidos com equações de predição de BU

Algumas equações foram desenvolvidas para tentar prever as unidades de amargor da cerveja. Em uma revisão realizada por HALL M. L. (1997) há o detalhamento e a comparação entre estes modelos. Diversas variáveis estão envolvidas e são colocadas em discussão. Desde a quantidade de α -ácidos presente no lúpulo utilizado para a produção da cerveja, como o tempo de fervura do mosto e sua gravidade específica. Através da Equação 6 é possível calcular as unidades de amargor (*Bitterness Units*).

$$BU = \frac{\text{Lúpulo(mg)} \cdot \alpha\text{-ácidos no lúpulo (\%)} \cdot \text{Fator de Utilização(\%)}}{\text{litros de cerveja}} \quad (\text{Eq. 6})$$

Nesta equação a variável mais discutida é o Fator de Utilização (quantidade de iso- α -ácidos presentes na cerveja em razão da quantidade de α -ácidos presentes no lúpulo adicionado ao processo de produção). Hall (1997) apresenta modelos matemáticos diferentes, nas quais as principais variáveis para prever o fator de utilização são o tempo de fervura e a concentração do mosto. Outras variáveis, como método de utilização do lúpulo (em flor, pellets ou extrato), variação da temperatura de ebulição durante a fervura e características de floculação da levedura são discutidas para o cálculo do fator de utilização. No entanto nenhum dos modelos apresenta a concentração de inóculo utilizada na fermentação como uma variável.

Para planejamento deste estudo foi utilizado modelo apresentado por Tinseth (1997) que utiliza como variáveis para cálculo do fator de utilização a densidade específica do mosto e o tempo de fervura, este modelo foi escolhido por ser bastante utilizado. A fator de utilização é calculado conforme Equação 7.

$$\text{Fator de utilização(\%)} = (1,65 \times 0,000125^{(\text{densidade mosto}-1)}) \times \left(\frac{1-e^{-0,04 \times \text{tempo}(\text{min})}}{4,15} \right) \quad (\text{Eq.7})$$

Ao aplicarmos o modelo proposto por Tinseth (1997), para este estudo, obtivemos o valor de 102,1 unidades de amargor (adição de 110g de lúpulo com 17,1% de teor de α -ácidos com tempo de fervura de 60 minutos e mosto com densidade de 1,048 g/cm³). Há uma diferença alta frente aos resultados obtidos em todas as amostras analisadas neste estudo, deixando evidente que outras variáveis influenciaram o resultado. Um dos fatores que podemos apontar é a deterioração dos α -ácidos presentes no lúpulo ao longo do seu armazenamento. O lúpulo

utilizado é proveniente da safra de 2013 e foi utilizado somente em 2016. Ono et al. (1984), analisaram a queda da concentração de α -ácidos em lúpulo em pellets ao longo do tempo e temperatura de armazenamento, assim como na presença ou ausência de ar na embalagem de estocagem. Neste estudo foi verificado que em temperaturas mais elevadas de armazenagem e na presença de ar há a aceleração na degradação dos α -ácidos. À temperatura de 25°C e na presença de ar, em menos de 48 semanas houve perda total dos compostos. Já sem a presença de ar a perda foi de 25%. No armazenamento a 0°C na presença de ar a perda foi de 20%, enquanto que para os lúpulos armazenados sem a presença de ar a perda foi de 5% em 48 semanas. Podemos concluir que mesmo que em boas condições de armazenagem houve uma degradação dos α -ácidos do lúpulo utilizado devido ao longo tempo de armazenamento. Apesar de muitos estudos realizados sobre os mecanismos da reação de isomerização dos α -ácidos e do fator de utilização ainda há inconsistências nos dados publicados e ainda é um ponto a ser solucionado na produção de cerveja (JAKSULA, 2010). Podemos adicionar a esta complexidade as variáveis estudadas neste trabalho pouco abordadas na literatura.

6. Conclusões

Foi possível observar diferença da medida de *Bitterness Units* entre as leveduras testadas dependendo da concentração de inóculo utilizada.

Para todas as condições estudadas, a maior perda de compostos de amargor ocorreu durante o período inicial da fermentação e de maior multiplicação celular. Como oportunidade de redução destas perdas é a utilização de concentrações de inóculo menores, para uma redução da biomassa gerada durante esta etapa e consequentemente um maior fator de utilização dos α -ácidos.

Os parâmetros de pH, teor alcoólico, extrato real e taxa de atenuação verificados estão em acordo com a literatura e foram indicativos para maior intensidade da fermentação das amostras inoculadas a maior concentração cél./mL⁹P, que também obtiveram maiores reduções de BU.

A redução de BU durante a maturação é um indicativo da associação destes compostos à levedura, pode-se observar uma redução na contagem de células em suspensão após esta etapa em todas as amostras.

Sendo assim, a presente pesquisa constatou diferentes perdas dos compostos de amargor com relação a concentração de inóculo e diferentes cepas. Este trabalho chama a atenção para as perdas durante a fermentação e que há variações para diferentes cepas, sendo recomendado que para menores perdas de amargor se utilize menores concentrações de inóculo.

7. Sugestão para trabalhos futuros

Avaliar variáveis do processo de fermentação (temperatura, concentração inicial de oxigênio e concentração de nutrientes) afetando diretamente a intensidade da atividade da levedura para entender sua associação aos compostos de amargor.

Avaliar o efeito de fatores de scale up nas perdas de amargor do processo, principalmente o tamanho dos fermentadores e maturadores, em especial para micro cervejarias, onde as informações são escassas.

Avaliar o efeito de gerações sucessivas de leveduras na perda do amargor.

Avaliar o efeito do tempo e da temperatura de maturação na perda do amargor.

Avaliar o efeito da perda do amargor para receitas com graus diferentes de amargor.

8. Referências

ALMAGUER, C. et al. Humulus lupulus – a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 66, n. 1, p. 35–50, 2014.

ANTUNES, A. **The 30 Best Craft Beers Available In Brazil**. **Forbes**, 18 de Fevereiro 2015. Disponível em: <<https://www.forbes.com/sites/andersonantunes/2015/02/18/the-30-best-craft-beers-available-in-brazil/#1843bf137ba4>>. Acesso em: 05 Agosto 2017

AQUILANI B., LAURETI T., POPONI S., SECONDI I. Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. **Food Quality and Preference**. v.41. p. 214-224. 2015.

ASBC – AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS - **Methods of Analysis**, online. Beer Method 9. pH. Approved 1958, rev. 1975. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A. doi: 10.1094/ASBCMOA-Beer-9.

ASBC – AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS - **Methods of Analysis**, online. Beer Method 23. Bitterness. Approved 1968, rev. 1975. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A. doi: 10.1094/ASBCMOA-Beer-9.

ASBC – AMERICAN SOCIETY OF BREWING CHEMISTS - **Methods of Analysis**, online. Yeast Method 3. Microscopy Yeast Cell Counting. Approved 1958, rev. 1975, 1988, 2011. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A. doi: 10.1094/ASBCMOA-Beer-14.

ASSOCIATION GERMAN HOP INDUSTRY. **MARKET REPORT JULY 2014**. [s.l: s.n.].

BAMFORTH, C. W. Beer: an ancient yet modern biotechnology. **Chemical Educator**, 5, 102-112, 2000.

BARBOZA, M. Q. **O negócio milionário das cervejas artesanais Cada vez mais brasileiros adotam as cervejas especiais e.** Disponível em: <http://www.istoe.com.br/reportagens/319458_O+NEGOCIO+MILIONARIO+DAS+CERVEJAS+ARTESANAIS>. Acesso em: 5 jun. 2015.

BARTH-HAAS GROUP. **Hops 1970/71**. Nuremberg: [s.n.], 1971.

BARTH-HAAS GROUP. **Beer Production - Market Leaders and their Challengers in the Top 40 Countries in 2012**. [s.l: s.n.], 2013.

BARTH-HAAS GROUP, **THE BARTH REPORT - HOPS 2016/2017**, Nuremberg: [s.n.], 2016.

BENARD, M. Determination of Repeatability and Reproducibility of EBC Accepted Methods: V - Beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, n. 3, p. 135–138, 16 maio 2000.

BENITEZ, J.L., FORSTER, A., DE KEUKELEIRE, D., MOIR, M., SHARPE, F.R., VERHAGEN, L.C., WESTWOOD, K.T. **European Brewery Convention Manual of Good Practice: Hops and Hop Products**. pp. 4-41. 1997.

BOULTON C., QUAIN D., **Brewing Yeast and Fermentation**, Blacwell Scienci. 2001.

BISHOP, L. R. The E.B.C. scale of bitterness. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 73, p. 525–527, 1967.

BREWERS ASSOCIATION, National Beer Sales & Production Data, disponível em: <https://www.brewersassociation.org/statistics/national-beer-sales-production-data/>. Acesso em: 20 mai. 2017

COOTE, N. e KIRSOP, B.H., Factors responsible for the decrease in pH during beer fermentations, **Journal of The Institute of Brewing.**, 82:149–153, 1976.

CHRISTMANN, E. P., & BADGETT, J. L. Interpreting assessment data: Statistical techniques you can use. NSTA Press. 2009.

DE COOMAN. Hopping Technology in Relation to Beer Bitterness Consistency and Flavor Stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 2007.

DIXON I. J. Hop Substances and Yeast Behaviour. **Journal of The Institute of Brewing.** v.73. 1967.

EDELEN CL, MILLER JL, PATINO H. Effects of yeast pitch rates on fermentation performance and beer quality. **Tech Q—Master Brew Assoc Am** 33:30–32, 1996.

ELZINGA, K.G.; TREMBLAY, C.H.; TREMBLAY, V.J. Craft Beer in The United States: History, Numbers and Geography. **Journal of Wine Economics**, v.10, p.242-274, 2015.

ERTEN H., TANGULER H., CAKIROZ H., The Effect of Pitching Rate on Fermentation and Flavour Compounds in High Gravity Brewing. **Journal of The Institute of Brewing.** v. 113. p. 75-79. 2007.

FERGUS G. P. e GRAHAM, G. S.; **Handbook of Brewing.** Second Edi ed.Boca Raton: [s.n.], 2006.

GIORGI, V.V. “Cultos em cerveja”:discursos sobre a cerveja artesanal no Brasil. **Soc e Cult.**, v.18, p. 101-111, 2015.

GIOVENZANA, V.; BEGHI, R.; GUIDETTI, R. Rapid Evaluation of Craft Beer Quality During Fermentation Process by vis/NIR spectroscopy. **Journal of Food Engineering**, v. 142, p. 80-86, 2014.

GOIA, M.R.; CHAVES, R. L. P. Cerveja Artesanal Carioca: A Fabricação de uma Cultura. Revista ADM.MADE, v.20, p.56-71, 2016

GÓMEZ-CORONA, C.; ESCALONA-BUENDÍA, H.B.; GARCÍA, M.; CHOLLET, S.; VALENTÍN, D. Craft vs. Industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, v.96, p. 358-367, 2016.

GRASSI, S.; AMIGO, J.M.; LYNDGAARD, C.B.; FOSCHINO, R.; CASIRAGHI, E. Beer fermentation: Monitoring of process parameters by FT-NIR and multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v.55, p. 279-286, 2014.

HALL M. L., What's your IBU. **Zymurg Special**, 1997.

HOP GROWERS OF AMERICA. **2013 Statistical report**. [s.l: s.n.].

HOUGH, J. S., E HUDSON, J. R., Influence of Yeast Strain on Loss of Bittering Material During Fermentation, **Journal of the Institute of Brewing**, v67, p241, 1961

HOWARD, G. A. Estimation of the bitterness of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 74, p. 249–251, 1968.

HUGHES, P. The Significance of Iso- α -Acids for Beer Quality Cambridge Prize Paper. **The Institute of Brewing & Distilling**, v. 106, n. 5, p. 271–276, 2000.

HUGHES, P. S.; SIMPSON, W. J. Production and Composition of Hop Products. **MBAA Technical Quarterly**, v. 30, p. 146–154, 1993.

ISTOÉ. **O negócio milionário das cervejas artesanais**. Disponível em: <http://www.istoe.com.br/reportagens/319458_O+NEGOCIO+MILIONARIO+DAS+CERVEJAS+ARTESANAIS>. Acesso em: 5 jun. 2015.

JAKSULA B., AERTS G., DE COOMAN L. Hop α -acids isomerisation and utilisation: an experimental review. **Cerevisia** v. 35. p. 57-70. 2010.

LAWS, D. R. J.; MCGUINNESS, J. D.; RENNIE, H. The losses of bitter substances during fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 78, p. 314–321, 1972.

LIU, C. et al. Effect of Boiling Parameters on the Ratio of trans-Iso-alpha-acids and cis-Iso-alpha-acids in Wort. **Technical Quarterly**, p. 1–6, 2009.

ONO, M., KAKUDO, Y., YAMAMOTO, Y., NAGAMI, K., KUMADA, J.,. Quantitative analysis of hop bittering components and its application to hop evaluation. **J. Am. Soc. Brew. Chem.** 42 (4), 167–172. 1984

KIRIN HOLDINGS. **Kirin Beer University Report Global Beer Consumption by Country in 2015**. [s.n.] 2016.

MALOWICKI, M. G.; SHELLHAMMER, T. H. Isomerization and degradation kinetics of hop (*Humulus lupulus*) acids in a model wort-boiling system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 11, p. 4434–4439, 2005.

MEADEN PG & TAYLOR NR. Cloning of a yeast gene which causes phenolic off-flavours in beer. **Journal Institute of Brewing**: 353–357, 1991.

MCGOVERN , P. et al. Fermented beverages of pre - and proto - historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2004.

MCMURROUGH, I.; CLEARY, K.; MURRAY, F. Applications of High-Performance Liquid Chromatography in the Control of Beer Bitterness. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 44, n. 12, p. 101–108, 1986.

MEILGAARD, M. Hop analysis, cohumulone factor and the bitterness of beer: review and critical evaluation. **Journal Institute of Brewing**, 1960.

MEUSSDOERFFER, F. G. **A Comprehensive History of Beer Brewing**, in Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets, 2009.

MORITZ, E. R., e MORRIS, G. H. **A Text-book of the Science of Brewing**, E. & F. N. Spon, 1981.

MULLER R.E., FELS, S. & GOSSELIN, Y. Brewery fermentations with dried lager yeast. **Proceedings of the 26th Congress of the European Brewery Convention** Maastricht, 431-8, 1997.

O'CONNOR-COX, E. S. C. E INGLEDEW, W. M., Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. **Journal of Industrial Microbiology**, 1991

O' ROUKER, T. **The BREWER International**, V 3, 1, 2003.

PAPAZIAN, Charles. Beer Styles: Their Origins and Classification .In: FERGUS G. P. e GRAHAM, G. S.; **Handbook of Brewing**. Second Edition. Boca Raton: [s.n.], 2006.

PARKIN, E. J. The Influence of Polyphenols and Humulinones on Bitterness in Dry-Hopped Beer. [s.l.] **Oregon State University**, 2014.

PIRES, E.J.; TEIXEIRA, J.A.; BRÁYIK, T.; VICENTE, A.A. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. **Appl Microbiol Biotechnol**, v 98, p. 1937–1949, 2014.

REID, N.; MCLAUGHLIN, R.B.; MOORE, M;S. From Yellow Fizz to Big Biz: American Craft Beer Comes of Age. *Focus on Geography*, v.57, p.114-125, 2014.

RIGBY, F. L.; BETHUNE, J. L. Rapid methods for the determination of total hop bitter substances (iso -compounds) in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 61, n. 4, p. 325–332, 1955.

ROSA, N.A.; AFONSO, J.C. A química da cerveja. **Química e sociedade**, v.37, p.98-105, 2015.

SICOBESISTEMA DE CONTROLE DE PRODUÇÃO DE BEBIDAS. **Produção Cervejas E Refrigerantes - Mensal**. Disponível em: <http://gerencialpublico.cmb.gov.br/PROD_BEBIDAS_MENSAL.html>. Acesso em: 5 abr. 2015.

TINSETH, Glenn. **The Hop Page**, Disponível em: <<http://realbeer.com/hops/>>, Acesso em: 5 out. 2017.

VANBENEDEN, N. et al. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. **Food Chemistry**, v 107, 1, p. 221-230, 2008.

VERBELEN, P. J. et al. Impact of pitching rate on yeast fermentation performance and beer flavour. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 82, n. 1, p. 155–167, 2009.