

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

NATANE CRISTINI KLIEMANN

**MONITORAMENTO DAS DICETONAS VICINAIS DURANTE O
PROCESSAMENTO DA CERVEJA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2014

NATANE CRISTINI KLIEMANN

**MONITORAMENTO DAS DICETONAS VICINAIS DURANTE O
PROCESSAMENTO DA CERVEJA**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR Campus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Profa. Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva.

TOLEDO
2014

**TERMO DE APROVAÇÃO
DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

NATANE CRISTINI KLIEMANN

**MONITORAMENTO DAS DICETONAS VICINAIS DURANTE O
PROCESSAMENTO DA CERVEJA**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso II do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, Campus Toledo, e aprovado pela banca examinadora abaixo.

Profa. Dra. Gracinda Marina Castelo da Silva
ORIENTADORA / UTFPR Câmpus Toledo

Profa. Tatiana Shioji Tiunan
UTFPR Câmpus Toledo

Prof. Dr. Clóvis Bombardelli
UTFPR Câmpus Toledo

Toledo, Dezembro de 2014

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso", conforme Instrução Normativa Conjunta 01/11 da PROGRAD/PROPPG.

RESUMO

KLIEMANN, Natane Cristini **Monitoramento das dicetonas vicinais durante o processamento da cerveja** 2014. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos) – Universidade Tecnologia Federal do Paraná, Toledo, 2014.

Dentre os principais desafios que se apresentam no mercado industrial de produção de cerveja nos dias atuais, podemos citar o abastecimento do mercado com o menor custo possível e com qualidade, visando garantir as expectativas dos clientes e consumidores. A etapa de fermentação da cerveja representa aproximadamente 70% de todo o tempo necessário para sua produção, tendo uma obrigatoriedade de rigorosos controles de processo. Essa etapa é responsável pela formação de uma série de subprodutos, como as dicetonas vicinais (VDK). O VDK possui um baixo limiar de percepção pelo consumidor e passam sabor e odor desagradáveis. O objetivo deste trabalho foi realizar o acompanhamento do VDK para aferição da qualidade da cerveja desde o início da fermentação até a filtração da cerveja tipo pilsen, em três lotes. Foram monitoradas além do VDK algumas variáveis: como pH, extrato e álcool, temperatura e células em suspensão. A metodologia aplicada para a determinação do VDK consiste em extrair da cerveja em fermentação, em maturação e filtrada o VDK através da destilação, com uma reação entre o destilado e o reagente orto-fenilenodiamina, fornece um composto cuja absorbância medida é em 335 nm. O pH foi determinado após a completa imersão do eletrodo na amostra, o extrato e álcool das amostras de fermentação/maturação e filtrada foram determinados pelo equipamento *Beer Analyzer*. A temperatura foi obtida através do monitor de temperatura, e as células em suspensão foram determinadas por contagem do número de células, realizado em câmara de Neubauer em amostras de cerveja em fermentação/maturação. Obteve-se, como resultados do tempo total de fermentação média para os três lotes de 144 horas, em que os níveis médios de VDK foram de 0,11mg/L. A média dos valores de pH igual a 4, teor alcoólico 4,70 v/v%, extrato 2,00°P, concentração de células em suspensão próximo de 5×10^6 cel/ml e temperatura de 13°C. Na maturação teve duração médias para os três lotes de 90 horas, e níveis de VDK dentro da faixa esperada (0,07mg/L), as outras variáveis permaneceram constantes. Na etapa de filtração o níveis de VDK encontrados (0,07mg/L) média para os três lotes, demonstra que a cerveja tipo pilsen produzida pela indústria cervejeira é de qualidade, no qual que valores que VDK estão dentro da faixa permitida.

Palavras-chave: Dicetonas Vicinais, *Saccharomyces Cerevisae*, fermentação.

ABSTRACT

KLIEMANN, Natane Cristini **Monitoring of vicinal diketones in beer processing.** 2014. 49 f. Trabalho de conclusão de curso (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos) – Universidade Tecnologia Federal do Paraná, Toledo, 2014.

Among the main challenges that come at the industrial market of beer production in the current days, we can mention the provisioning of the market with the smallest possible cost and with quality, seeking to guarantee the customers' expectations and consumers. The stage of fermentation of the beer represents 70% of the whole necessary time approximately for his/her production, tends a compulsory nature of rigorous process controls. That stage is responsible for the formation of a series of by-products, as the local dicetonas (VDK). VDK possesses a low perception threshold for the consumer and they pass flavor and unpleasant odor. The objective of this work was to accomplish the attendance of VDK for gauging of the quality of the beer from I begin him/it of the fermentation to the filtration of the beer type pilsen, in three lots. They were monitored besides VDK some varied: as pH, extract and alcohol, temperature and cells in suspension. The applied methodology for the determination of VDK consists of extracting of the beer in fermentation, in maturation and filtered VDK through the distillation, with a reaction among distilled him/it and the reagent orto-fenilenodiamina, supplies a composition whose measured absorbance is in 335 nm. The pH was determined after the complete immersion of the electrode in the sample, the extract and alcohol of the fermentation / maturation samples and filtered were certain for the equipment Beer Analyzer. The temperature was obtained through the temperature monitor, and the cells in suspension were certain for counting of the number of cells, accomplished in camera of Neubauer in beer samples in fermentation / maturation. it was Obtained, as results of the total time of medium fermentation for the three lots of 144 hours, in that the medium levels of VDK were of 0,11mg/L. The average of the pH values same to 4, alcoholic content 4,70 v/v%, extract 2,00°P, concentration of cells in suspension close of 5×10^6 cel/ml and temperature of 13°C. In the maturation he/she had duration averages inside for the three lots of 90 hours, and levels of VDK of the expected strip (0,07mg/L), the other variables stayed constant. In the filtration stage the levels of found VDK (0,07mg/L) average for the three lots, demonstrates that the beer type pilsen produced by the industry brewer is of quality, in which that values that VDK is inside of the allowed strip.

Keywords: Diketones Vicinais, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

T	temperatura (°C)
t	tempo (s, min ou h)
V	volume de solução (L ou mL)
λ	comprimento de onda
u	massa molecular
%	porcentagem
pH	potencial Hidrogeniônico
CO ₂	dióxido de Carbono
ppm	partes por milhão
VDK	dicetona vicinal
EBC	Convenção Europeia Brewery
°P	graus platos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Etapas de fabricação da cerveja	13
Figura 2: Imagem de células de levedura do tipo <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , utilizadas no processo de fermentação da cerveja.....	18
Figura 3: Vias metabólicas da fermentação cervejeira.....	20
Figura 4. Representação do metabolismo da levedura cervejeira e os principais compostos químicos formados e consumidos na rota metabólica das Dicetonas Vicinais.....	22
Figura 5: Síntese do aminoácido valina pela célula de levedura e sua consequente formação e redução do diacetil.	23
Figura 6: Resultados do monitoramento da fermentação Lote 1. [a] Concentração de VDK (mg/L) em relação ao tempo (horas), [b] Concentração de extrato (°P) em relação ao tempo (horas), [c] Concentração de Álcool (v/v %) em relação ao tempo, [d] Células em Suspensão (10x6) (células/mL) em relação ao tempo.	33
Figura 7: Resultados do monitoramento da fermentação Lote 2. [a] Concentração de VDK (mg/L) em relação ao tempo (horas), [b] Concentração de extrato (°P) em relação ao tempo (horas), [c] Concentração de Álcool (v/v %) em relação ao tempo, [d] Células em Suspensão (10x6) (células/mL) em relação ao tempo.	34
Figura 8: Resultados do monitoramento da fermentação Lote 3. [a] Concentração de VDK (mg/L) em relação ao tempo (horas), [b] Concentração de extrato (°P) em relação ao tempo (horas), [c] Concentração de Álcool (v/v %) em relação ao tempo, [d] Células em Suspensão (10x6) (células/mL) em relação ao tempo.	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo Geral	11
1.1.2 Objetivos específicos	11
1.2 JUSTIFICATIVA	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Produção de Cerveja.....	13
2.1.1 Etapas do processo de fabricação da Cerveja	14
2.1.1.1 Moagem do Malte.....	14
2.1.1.2 Mosturação.....	14
2.1.1.3 Brassagem	15
2.1.1.4 Filtração do Mosto	16
2.1.1.5 Fervura do Mosto	16
2.1.1.6 Resfriamento do Mosto	17
2.1.1.7 Fermentação da Cerveja	17
2.1.1.7.1 Levedura	18
2.1.1.7.2 Diacetil.....	21
2.1.1.8 Maturação	24
2.1.1.9 Acabamento	25
2.1.1.10 Embalagem	26
2.2 CLASSIFICAÇÃO DA CERVEJA	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 MATERIAIS	27
3.1.1 Materiais para destilação.....	27
3.2 REAGENTES	27
3.3 EQUIPAMENTOS	28
3.4 METODOLOGIA.....	28
3.4.1 Obtenção da Amostra.....	28
3.4.2 Preparo da Amostra	28
3.4.3 Princípio do Método.....	29
3.4.4 Determinação de dicetonas totais (VDK).....	29
3.4.4.1 Apresentação dos resultados	29
3.4.5 Determinação da Temperatura.....	30
3.4.6 Determinação do pH	30
3.4.7 Determinação do Extrato aparente e Álcool	31
3.4.8 Determinação das Células em Suspensão.....	31
4 RESULTADOS E DISCUSSÃOS	32
4.1 Fermentação	32
4.2 Maturação	39
4.3 Filtração.....	41
5 CONCLUSÃO	44
6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO	45
REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida conhecida desde as primeiras civilizações, caracterizando-se pela facilidade da formulação e pela grande complexidade do preparo. No qual segundo a definição utilizada por muitas cervejarias, é um extrato de malte de cevada, fervido, lupulado, resfriado e fermentado, que contém uma pequena quantidade de álcool, gás carbônico e açúcares não fermentescíveis (CARVALHO, 2011).

A cerveja pode ser descrita como um alimento praticamente completo, pois sua composição compreende compostos como: proteínas, aminoácidos, carboidratos (glucose, maltose, dextrinas etc), elementos minerais diversos (cálcio, fósforo, enxofre, etc), álcool, anidrido carbônico e grande parte das vitaminas do complexo B (KUNZE, 2006).

Segundo Garcia (2012) na indústria cervejeira, o processo produtivo divide-se basicamente em quatro etapas distintas, das quais: elaboração do mosto, fermentação, maturação, filtração/envase. Os tempos gastos em cada etapa são, respectivamente, 9, 192, 48 e 15 horas para um produto tradicional tipo cerveja pilsen (clara e baixa fermentação), totalizando 264 horas para produção da cerveja. (KUNZE, 2006). Em termos de produtividade, a fermentação da cerveja é a etapa mais crítica, sendo caracterizada como principal etapa na produção em uma cervejaria (AMARO, 2009).

O tempo total de fermentação possui elevada importância no processo como um todo, pois, se bem controlada essa etapa, pode-se reduzir custo, garantindo-se menos gastos com energia elétrica para fins de circulação de etanol nas camisas dos tanques de fermentação e ar comprimido, para abertura e fechamento das válvulas de frio dos tanques de fermentação (KUNZE, 2006).

No processo de fermentação do mosto, a principal reação da transformação é a conversão dos açúcares (substrato) em etanol e CO₂. Entretanto, essa reação não é única que acontece (CERRI, 2012). A cerveja é, na verdade, um coquetel de substâncias químicas que, somadas, dão as características sensoriais importantes aos produtos. Os principais subprodutos do processo de fermentação da cerveja

são: dicetonas vicinais, álcoois superiores, aldeídos, ésteres e ácidos carboxílicos (ISABEL & ALMEIDA, 2006).

A formação desses subprodutos é dependente da levedura utilizada, como também das condições nas quais a fermentação é conduzida, em especial temperatura e pressão (KUNZE, 2006).

Entre os subprodutos formados, as dicetonas vicinais (VDK) são as mais críticas, devido ao seu baixo limiar de percepção (na faixa de 0,10 ppm). Os principais representantes deste grupo são o diacetil (butanodiona) e a 2,3 pentanodiona (MOLL, 1991).

A qualidade do gerenciamento dessa etapa acarretará em um impacto positivo na qualidade do produto final, uma vez que as dicetonas vicinais, em que se não forem reduzidas a limiares abaixo de 0,10 ppm, serão facilmente percebidas pelo consumidor, através de um odor e sabor típicos indesejáveis (NAKATANI et al., 1984).

A implantação de processos eficientes e de baixo custo relacionados à redução dos teores de VDK na indústria cervejeira é uma ferramenta muito útil que permitirá ao mesmo tempo garantir atendimento do mercado, com menor custo e sem impacto negativo na qualidade sensorial do produto acabado (MOLL, 2001).

Tais processos demandam grandes cuidados nas cervejarias a fim de que se possa vir a minimizar o tempo gasto na etapa de fermentação, caso contrário ter-se-á como resultado altos custos, com a utilização de enzimas artificiais, e perda de mercado, devido ao aumento considerável do tempo total de processo, uma vez que as indústrias trabalham com baixo estoque de produto acabado em seus armazéns (SIQUEIRA et al., 2008).

Os processos tradicionais de fabricação de cerveja, os quais são os mais utilizados atualmente, em geral, são totalmente dependentes necessariamente das características físico-químicas do malte (matéria prima) utilizado pela cervejaria, pois a cevada de ser de boa qualidade em todas suas etapas de produção (SANDERSON et al., 2010).

Diante dessa situação, torna-se indispensável um estudo, de forma a ter um controle da formação e redução de dicetonas vicinais na etapa de fermentação da cerveja, no qual deve ser simplificado ao máximo, reduzindo, assim, gastos com operação e manutenção e potencializando sua eficiência.

Com o objetivo de atendimento de mercado, redução de custo e manutenção da qualidade final do produto acabado, este trabalho propõe um monitoramento do VDK na produção da cerveja tipo pilsen.

1.1 OBJETIVO

1.1.1 Objetivo geral

Realizar o acompanhamento do VDK para aferição da qualidade da cerveja desde o início da fermentação até a filtração da cerveja tipo pilsen.

1.1.2 Objetivos específicos

Obtenção da amostra de três lotes nas etapas de fermentação, maturação e filtração do processo de fabricação da cerveja.

Realização das análises do VDK, pH, extrato, células em suspensão, teor alcoólico, e acompanhamento da temperatura.

Avaliar as informações das análises para:

- verificar quais são os fatores que afetam o aparecimento do VDK.
- obter a variação dos níveis de VDK durante o estágio da fermentação.
- durante a etapa de maturação observar se os valores de VDK diminuem ou se permanecem constantes.
- averiguar se na etapa de filtração da cerveja os valores de VDK estão de acordo com os valores permitidos pela legislação, para que o produto final esteja dentro das especificações.

1.2 JUSTIFICATIVA

O monitoramento do VDK no processo de fabricação de cerveja é de extrema importância, pois dentre os principais desafios que se apresentam no mercado industrial de produção de cerveja nos dias atuais, visa garantir a satisfação dos clientes e consumidores.

A etapa de fermentação da cerveja representa o maior tempo de produção, com rigorosos controles de processo. Durante o processo de fermentação uma série de subprodutos é formada, os quais, ao mesmo tempo em que são determinantes na composição de muitos aromas da cerveja, se produzidos em uma quantidade maior podem passar para o produto final, sabor e odor desagradável.

Dentre esses subprodutos, o VDK constitui o principal componente da fermentação, se produzidas em elevadas quantidades proporcionam ao produto aspecto de deterioração, causando um problema, pois possuem um baixo limiar de percepção pelo consumidor. Um dos motivos seria a instabilidade da qualidade das matérias primas e do controle de processo durante a fermentação.

O monitoramento do VDK torna-se indispensável para produção de cerveja, pois com o seu monitoramento, os níveis de VDK se estiverem fora do permitido pela legislação podem ser controlados, gerando assim impactos positivos no tempo total de fermentação e na qualidade do produto final.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO DE CERVEJA

A cerveja é uma bebida tradicional carbonatada, obtida pela fermentação alcoólica do mosto de malte de cevada com outros cereais malteados (ou não) e água potável, por ação de levedura cervejeira e pela adição de lúpulo. A fabricação da cerveja baseia-se em distintos processos, apresentado na Figura 1.

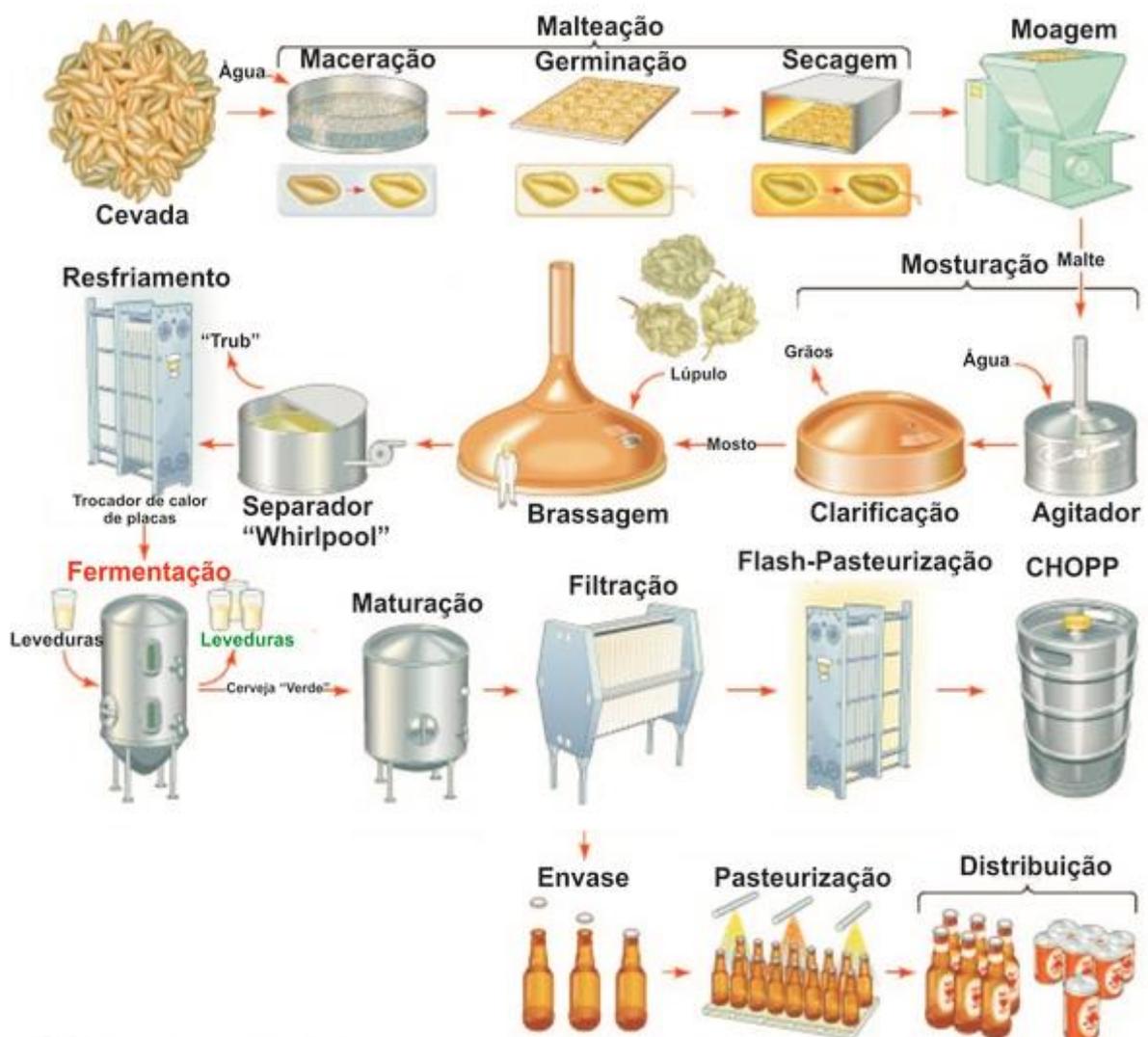


Figura 1: Etapas de fabricação da cerveja

Fonte: CARNEIRO (2010)

Pela Figura 1, o processo cervejeiro inicia-se com preparo da matéria prima (cevada). Este cereal é o preferido devido a uma série de fatores, dentre eles está o fato da cevada ser rica em amido, e possuir um alto teor de proteínas em quantidade suficiente para fornecer os aminoácidos necessários para o crescimento da levedura e possuir substâncias nitrogenadas que desenvolvem um papel importante na formação da espuma (CARNEIRO, 2010).

A cevada deve ser transformada em malte na fabricação de cerveja, onde vai conferir à bebida o sabor característico, cor e aroma. O malte é um produto abundante em açúcar, obtido da germinação parcial dos grãos de cereais. O processo é obtido basicamente em três etapas, primeiramente a cevada é imersa em água até absorver determinado teor de umidade; logo após esta é germinada sob condições controladas e por fim faz-se a secagem, o que interrompe seu crescimento (germinação). Em todas estas etapas é imprescindível o controle da temperatura, umidade e vazão de ar (SANTOS, 2012).

2.1.1 Etapas do processo de fabricação da cerveja

2.1.1.1 Moagem do malte

Constitui um preparo para a mosturação e também tem influência significativa no rendimento da brassagem, isto é, a solubilização máxima do conteúdo do grão do malte. A moagem do malte não deve ser muito fina a ponto de tornar lenta a filtragem do mosto ou, ao contrário muito grossa, o que dificulta a hidrólise do amido (GARCIA, 2012).

2.1.1.2 Mosturação

O processo de preparação do mosto subdivide-se em: desintegração dos cereais ou matérias-primas; maceração e extração dos conteúdos dos grãos;

separação dos materiais sólidos da fase líquida (filtração); aquecimento do mosto com o lúpulo (cocção), resfriamento do mosto e eliminação dos materiais que conferem turvação ao produto (BOULTON, 2001).

A mosturação compreende a mistura do malte moído com a água, e a adição de seu complemento, caso necessário, e do caramelo, se a cerveja a ser processada for escura. O objetivo é promover a gomificação e posterior hidrólise do amido a açúcares. O pH e a temperatura interagem para controlar a degradação do amido e das proteínas. Pelo processo de mosturação, consegue-se obter a extração de 65% dos sólidos totais do malte que em dissolução ou suspensão em água constituirão o mosto para a fermentação da cerveja (SANTOS, 2012).

2.1.1.3 Brassagem

Têm por objetivo a solubilizar a maior quantidade possível de matérias hidrossolúveis do malte e dos adjuntos de fabricação empregados, o que se denomina extrato. Em um tanque são misturados malte moído e água aquecida de 38 a 50°C, de modo a formar uma pasta homogênea; a temperatura é elevada gradualmente, cerca de 1°C por minuto, mas mantida abaixo da ebulição (de 65 a 70°C) (CARVALHO, 2011).

Vários fatores influenciam a qualidade e o rendimento da brassagem e, dentre eles, se destacam a qualidade do malte e dos adjuntos utilizados; a composição química da água utilizada; a relação água/quantidade de matéria sólida; o diagrama de tempos/temperaturas nas caldeiras de mostura e de adjuntos (SANDERSON, 2010).

2.1.1.4 Filtração do mosto

Nesta etapa ocorre a separação do bagaço de malte do mosto líquido, levando-se em conta os aspectos qualitativos (mosto límpido, com baixa turvação) e

econômicos, ou seja, obtenção do máximo de extrato e rapidez de operação. Normalmente utilizam - se filtros de terra diatomácea, separadores centrífugos ou clarificadores e filtros prensa (KUNZE, 2006).

2.1.1.5 Fervura do mosto

Lúpulo, componente responsável pelo aroma acre e sabor amargo característicos da cerveja, sendo conhecido e utilizado desde antiguidade como planta medicinal (OLIVEIRA, 2011).

A fervura do mosto a 100 °C com o lúpulo estabiliza sua composição, inativando as amilases e proteases, por causar coagulação das proteínas, que se precipitam em flocos. O processo leva em torno de duas horas. Outros efeitos da fervura no mosto são a aromatização, a concentração e a esterilização, além da caramelização de alguns açúcares. Também ocorrem diversas reações químicas entre os componentes do mosto, como a coagulação do tanino do lúpulo por reação com a proteína (MEDEIROS, 2010).

Muitas vezes, o lúpulo é acrescentado quando a fervura está no meio ou mesmo no final, outras vezes pode ser adicionado em parcelas durante o processamento. A razão é que os óleos essenciais responsáveis pelo desenvolvimento do aroma são voláteis, podendo perder-se na fervura. Se o açúcar (xarope) é usado como complemento do malte, sua adição é feita no final da fervura (EVANGELISTA, 2012).

Segundo Moll (2001) é uma planta trepadeira da família das urticáceas, típica do clima frio, sendo encontrada em estado selvagem, porém para a produção de cerveja o lúpulo deve ser cultivado. É uma planta dioica, o que quer dizer que produz flores masculinas e femininas. Ordenadas em espigas e glândulas secretoras de resinas e óleos de substâncias amargas, que dá o amargor típico e contribuem para o aroma característico da cerveja.

2.1.1.6 Resfriamento do mosto

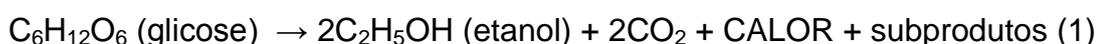
Tem por objetivo separar o material sólido em suspensão no mosto; resfriar até a temperatura correta (10 °C) para o início da fermentação e aerar o mosto de maneira estéril e com um conteúdo correto de oxigênio. Esta fase da fabricação de cerveja é muito importante e delicada por suas consequências em todas as demais fases subsequentes do processo. São particularmente importantes os aspectos microbiológicos envolvidos nesta operação (MOLL, 2001).

2.1.1.7 Fermentação da cerveja

A fermentação começa quando o fermento (levedura) é adicionado em um fermentador contendo o mosto. A levedura consome açúcares e aminoácidos presentes no mosto, juntamente com alguns micronutrientes e produz etanol, dióxido de carbono e vários compostos aromatizantes. Para a ocorrência das vias metabólicas essenciais para a produção da cerveja é preciso que o mosto cervejeiro esteja com as condições que favoreçam o desenvolvimento das leveduras, ou seja, deve possuir os elementos-chave que propiciem a fermentação: açúcares, proteínas, gorduras e traços de alguns minerais (OLIVEIRA, 2011).

Segundo Kunze (2006) os açúcares, principais substratos do processo fermentativo da cerveja, são fermentados de acordo com a equação química de Gay-Lussac.

Segundo a equação (1), em condições de anaerobiose a levedura fermentam uma molécula simples de açúcar (glicose), produzindo duas moléculas de etanol, duas de gás carbônico e energia (GARCIA, 2012).



Kunze (2006) evidencia que as leveduras podem utilizar os açúcares através de duas vias. Os fatores que definem a via a ser utilizada são a quantidade de

açúcar e a quantidade de oxigênio disponível no meio. A equação de Gay-Lussac descreve, de forma simplificada, a via realizada quando o meio apresenta alta concentração de açúcares e ausência de oxigênio.

Para o processo fermentativo, a via de maior interesse é a regida pela equação (1), pois a formação de etanol é desejada ao final do processo, além disso, as condições do processo favorecem a utilização dessa via pela levedura (BAMFORTH, 2003).

2.1.1.7.1 Levedura

A levedura é o único organismo vivo que consegue alternar entre a respiração e fermentação. Apesar da presença de oxigênio, a levedura irá sempre tomar o caminho da fermentação para consumir a glicose (KUNZE, 2006).

A levedura é um microrganismo unicelular (Figura 2) responsável, na cervejaria, pela fermentação alcoólica, que obtém a sua energia na presença de oxigênio (aeróbio) durante a fase de respiração e, na ausência de oxigênio (anaeróbio), durante a fase de fermentação (MEDEIROS, 2010).

As leveduras podem ser classificadas em diferentes espécies, tais como *Saccharomyces uvarum*, *Saccharomyces cerevisiae* (CARVALHO, 2011). A cerveja americana e a alemã *Pilsener* do tipo *Lager* são produzidas pela fermentação baixa, por cepas de *S. uvarum*. São consideradas como de alta atividade fermentativa e de menor capacidade respiratória que a *S. cerevisiae*. As cervejas inglesas *Porter* ou *Stout* do tipo *Ale* são, em geral, produzidas por fermentação superficial (alta), realizadas por cepas de *S. cerevisiae* (BAMFORTH, 2003).

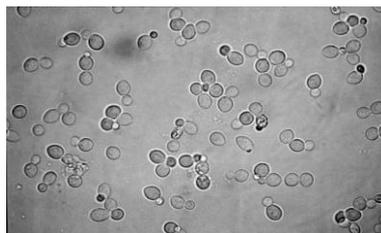


Figura 2: Imagem de células de levedura do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, utilizadas no processo de fermentação da cerveja. Fonte: Brites *et al.*, 2000

De acordo com Carvalho et al., (2011), o desempenho das leveduras cervejeiras na fermentação é influenciado e controlado por vários fatores importantes tais como:

- Características genéticas: a escolha da cepa de levedura empregada.
- Fisiologia celular: a tolerância ao stress pelas células de levedura, a viabilidade e a vitalidade das células e a concentração celular do inoculo.
- Disponibilidade nutricional: a qualidade e concentração dos macronutrientes fermentescíveis, bem como, a presença de íons metálicos no mosto.
- Condições físicas: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e a densidade do mosto.

A fermentação da cerveja é um processo primário em que normalmente tem duração uma semana, no entanto dependendo principalmente da temperatura, tem-se a existência de duas fases de fermentação, com distintas temperaturas entre 10 e 15 °C respectivamente. Na primeira fase de fermentação, em que a levedura excreta para o meio o diacetil, reabsorvendo-o na segunda fase. Ocorrendo qualquer falha no controle da temperatura nessa fase, a curva de redução de substrato fermentescível pela levedura ficará mais agressiva, levando assim parte das células a decantar e reduzir drasticamente a população de levedura em suspensão na segunda fase de fermentação, que é o momento em que a levedura irá reabsorver o diacetil do meio até limiares abaixo de 0,10 ppm (CARNEIRO, 2010).

Após a fermentação uma porção da levedura é removida para a reutilização da mesma, e a cerveja fermentada permitindo a sua maturação (MEDEIROS, 2010).

Este processo ocorrerá por um período de cinco dias, pelo menos enquanto a fermentação primária e se necessário, a fim de obter um perfil de sabor mais equilibrada e desejável, é necessário, pois, juntamente com a produção de álcool, a levedura produzir uma variedade de subprodutos metabólicos, que entram a cerveja (MELLO, 2001).

A Figura 3 ilustra algumas vias metabólicas que ocorrem na fermentação do mosto cervejeiro.

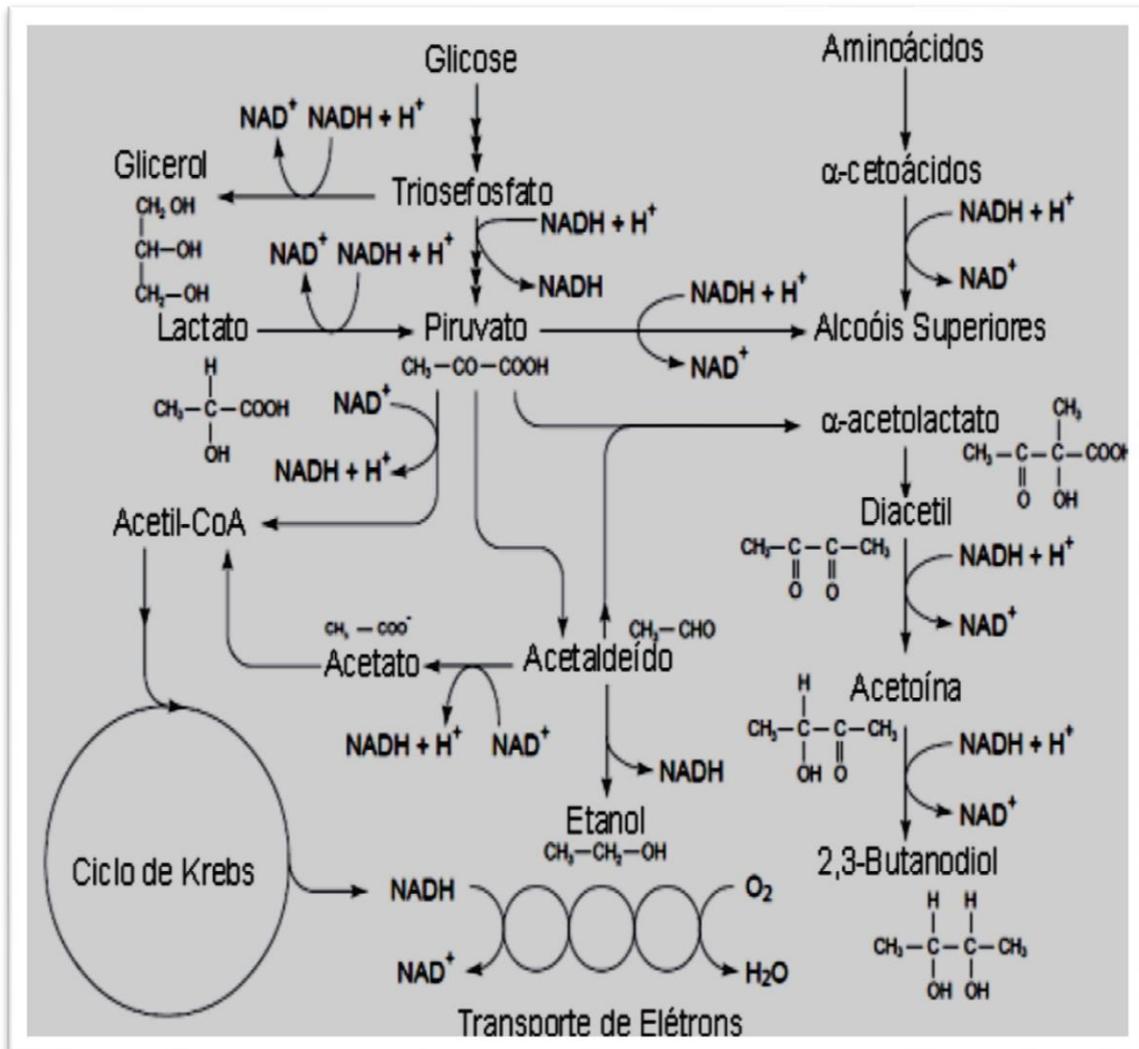


Figura 3: Vias metabólicas da fermentação cervejeira
 Fonte: Adaptado de CARNEIRO (2010).

A partir da análise da Figura 3 observa-se que os açúcares (glicose) são as principais fontes de energia para a levedura e o elemento necessário para a produção de etanol. Os compostos gerados a partir das vias metabólicas dos aminoácidos e as gorduras são fundamentais para a construção de uma estrutura celular saudável e para o desenvolvimento das substâncias responsáveis pelo *flavour* (sabor) da cerveja (CARNEIRO, 2010).

Alguns deles, em particular 2,3- butanodiona, vulgarmente conhecido como o diacetil (VDK), no qual tem sabor indesejável. Dessa forma o diacetil pode ser descrito como cheiro de caramelo, em que é utilizado como agente aromatizante de manteiga em doces e pipocas "amanteigados", mas com o limiar de gosto de cerca

de 100 ppb, ou 100 microgramas por litro, a sua presença na cerveja pode ser um grande problema (SWINDELL, 1996).

Leveduras do gênero *Saccharomyces* produzem α -acetolactato em concentrações consideráveis durante a fermentação e este composto pode ser facilmente convertido a acetoína e diacetil, necessariamente ocorre na presença de O_2 (MOLL, 1991).

O α - acetolactato pode ser degradado não enzimaticamente a diacetil através da descarboxilação oxidativa, e sua decomposição depende das propriedades químicas e físicas das bebidas alcoólicas. Segundo estudos a evidência concreta é que o diacetil é formado a partir do ácido α -acetolactato como metabólito secundário na biossíntese do ácido α -oxoisovalérico, intermediário da biossíntese da valina (BERGEN,2006).

2.1.1.7.2 Diacetil

O diacetil conhecido como 2,3 butanodiona fórmula $C_4H_6O_2$, cor amarelo esverdeado, peso molecular 86,09 u e ponto de ebulição $88^\circ C$ é um composto de alto valor agregado por produzir o aroma da manteiga e outros produtos lácticos. Entretanto é desagradável em alguns produtos como, por exemplo: suco de maçã, cerveja e outras bebidas alcoólicas (SHIMITT, 2010).

Necessariamente sua concentração deve estar abaixo do nível que se possa sentir (0,07 - 0,10 mg/L), caso contrário, tal concentração irá conferir à cerveja um sabor de manteiga rançosa (RODRIGUES, 2003).

Diacetil e 2,3-pentanodiona são importantes contribuintes para o sabor e aroma da cerveja. Os químicos orgânicos classificam como cetonas, e o diacetil é normalmente denominado de 2,3-butanodiona na literatura. Às vezes, essas duas cetonas são agrupados e determinados como VDK (BERGEN, 2006).

A presença de diacetil é normalmente caracterizado por um gosto amanteigado ou tom caramelo. Em cerveja fresca o sabor pode ser confundida com a de maltes caramelo (MEDEIROS, 2010).

Estudos sobre o diacetil da cerveja começaram com o trabalho de Pasteur em 1870. No qual, utilizando a microscopia, descobriu o que hoje é conhecido como bactérias lácticas, foram responsáveis por muitos *off-flavors* na cerveja. A doença sarcina termo utilizado para descrever este efeito. Aparentemente, o envolvimento de diacetil na doença sarcina foi descoberto cedo, mas em 1939 Shimwell verificou este composto com o gosto e o cheiro de manteiga. Mesmo atualmente, estima-se que 20 % dos consumidores de cerveja não detectam a presença de diacetil, mesmo em concentrações extremamente elevadas (BERGEN, 2006).

Durante as primeiras pesquisas realizadas o único mecanismo conhecido e responsável até então pela formação de diacetil era a infecção bacteriana causada por condições insalubres. Cervejeiros práticos acreditavam que algum outro fator deveria estar envolvido, pois os tons amanteigados ocasionalmente apareceram na cerveja fabricada em locais totalmente higienizados (KUNZE, 2006).

Os principais avanços ocorreram durante os anos 1950 e início dos anos 1960. J. Owades desenvolvia uma técnica eficaz para a medição do diacetil, e usando este método para estudar o destino do composto na fabricação de cerveja. O estudo apontou para cultura de levedura como um grande responsável, tanto na produção e a na redução de diacetil (BERGEN, 2006).

Na primeira fase de fermentação do mosto cervejeiro, como já citado a levedura excreta para o meio precursores do diacetil, o alfa-acetolactato. Esse processo bioquímico ocorre durante as vias de formação da valina e da isoleucina, que são aminoácidos fundamentais para o metabolismo da levedura. Na segunda fase de fermentação, esse diacetil formado é reabsorvido pelas células ativas da levedura e sintetizado por ela própria em acetoina e 2,3 butanodiol, que não interferem no sabor da cerveja, durante as etapas subsequentes (BOULTON et al., 2001). Tal processo está representado pelas Figuras 4 e 5.

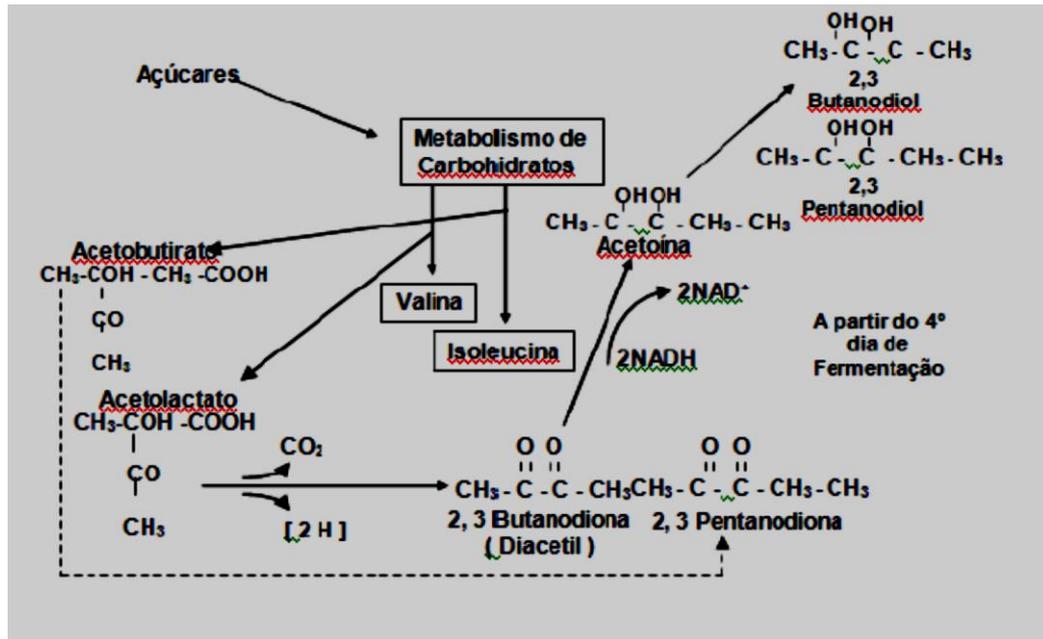


Figura 4. Representação do metabolismo da levedura cervejeira e os principais compostos químicos formados e consumidos na rota metabólica das Diketonas Vicinais

Fonte: MEDEIROS (2010)

A Figura 5 evidencia os componentes químicos envolvidos na síntese do aminoácido valina pela levedura cervejeira e sua consequente formação/eliminação para o meio do VDK, bem como sua posterior reabsorção pela própria levedura e conversão a álcool (2,3-butanodiol).

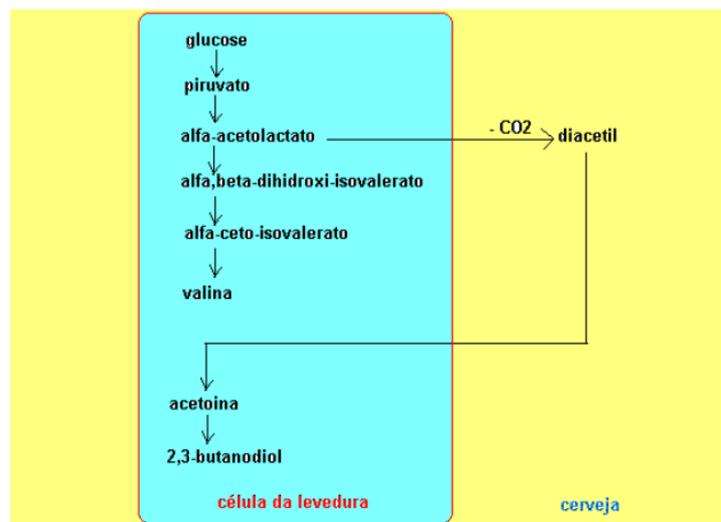


Figura 5: Síntese do aminoácido valina pela célula de levedura e sua consequente formação e redução do diacetil

Fonte: STWART & RUSSEL (2005)

Os principais fatores que interferem diretamente na formação e redução do diacetil são apresentados a seguir.

- Temperatura: Sendo os precursores do VDK produzidos no metabolismo da levedura, em que as altas temperaturas de fermentação e a introdução de oxigênio aumentam a probabilidade de ocorrer à formação do diacetil. Segundo Moll (1991) a manutenção de uma temperatura de fermentação suficientemente elevada durante as fases de desaceleração e estacionária pode influenciar no aparecimento em quantidades elevadas do VDK, contudo o efeito sobre a redução é ainda maior, de modo que o resultado final é de se esperar um nível mais baixo de VDK na cerveja como produto acabado, portanto a cerveja será de boa qualidade.
- pH: Quanto menor o pH, mais a levedura transformará acetolactato em diacetil. O consumo de 50 % do substrato e pH de final de fermentação abaixo de 4,4 são fatores importantes para a redução do VDK na segunda fase de fermentação (MEDEIROS, 2010).
- Alfa amino nitrogênio: Altas concentrações de alfa amino nitrogênio (FAN) indicam boa concentração de valina e isoleucina e conseqüente redução na formação de VDK, na primeira fase de fermentação (MEDEIROS, 2010).
- Fermento: Fermento (levedura) debilitado não consegue reduzir todo o diacetil ao final da fermentação, gerando tempos totais de fermentação elevados (KUNZE, 2006).
- Contaminação microbiológica: O efeito do VDK produzido por contaminação microbiológica (*Lactobacillus* e *Pediococcus*) é facilmente percebido, pois, além do aroma e paladar típicos do VDK, é percebido claramente um paladar ácido no final da degustação (BERGEN, 2006).

2.1.1.8 Maturação

Durante este período ocorre uma fermentação secundária e lenta na cerveja 'verde', ocasionando alterações de aroma e sabor, além de alterações em seu

sistema coloidal, proporcionando a clarificação por precipitação de proteínas, leveduras e sólidos solúveis. Sendo nesta fase em que são adicionados os antioxidantes para prevenir a ação de oxigênio residual. Durante o período de armazenamento são formados ésteres, dando origem a aroma e sabor que caracterizam a cerveja madura (KUNZE, 2006).

A determinação do acetolactato durante o processo de maturação indica a quantidade de diacetil que a cerveja poderá apresentar depois de pronta. Também, através da dosagem de 2-acetolactato, pode-se verificar se o processo fermentativo foi completo e prever quanto de diacetil estará presente após o seu envelhecimento. A redução do diacetil dependente da permanência do contato da levedura com a cerveja e, contudo a sua remoção prematura também pode levar a um alto nível de diacetil (BERGEN, 2006).

2.1.1.9 Acabamento

Nesta fase inclui a clarificação e a carbonatação. A clarificação pode ser feita através de filtros ou por via biológica. O armazenamento a 0 °C durante semanas permite a precipitação de proteínas instáveis, leveduras e resinas (MELLO, 2001).

A cerveja, após clarificação, é carbonatada sobre pressão usando-se gás carbônico. Posteriormente esta é clarificada em filtros de terra diatomácea e passa por filtros de placa. Após a fabricação, a cerveja descansa em dorna por 24 horas antes de ser embalada. O limite de células residuais de leveduras após a filtração deve ser menor que 10 células/100 mL de cerveja (GARCIA, 2012).

A formação de valores altos de diacetil no produto acabado pode ser atribuída a alguns fatores como a abertura precoce do frio nos tanques de fermentação, deficiência de nutrientes para levedura ou curto período de tempo durante a maturação (RODRIGUES, 2003).

2.1.1.10 Embalagem

A cerveja pode ser acondicionada em latas e garrafas e pasteurizada ou ultrafiltrada. A pasteurização é realizada em túneis onde a temperatura é elevada até cerca de 60°C e mantém-se por período necessário para garantir a destruição dos microrganismos deteriorantes, sendo em seguida resfriada (EVANGELISTA, 2012).

A cerveja em barriletes, denominada Chopp, não é pasteurizada e por isso deve ser armazenada a baixa temperatura, em recipiente de aço inoxidável, alumínio ou madeira, de volume variável e ainda assim tem sua conservação limitada de cerca de um mês (SANTOS, 2012).

2.2 CLASSIFICAÇÃO DA CERVEJA

A cerveja pode ser dividida em dois distintos grupos.

Tipo Ale, dentre as quais se destacam a *Porter* e a *Stout*, e as do tipo *Lager*, como a Pilsen, a Munique e a Bock. As cervejas do tipo Ale são fabricadas por meio de fermentação superficial ou “alta”. São, em geral, de cor clara, com sabor pronunciado de lúpulo, ligeiramente ácidas, e seu teor alcoólico varia de 4 % a 8 %. O processo de fermentação ocorre entre a temperatura de 20 °C e 25 °C, com duração de 2 a 5 dias e a maturação entre 4,5 °C e 8 °C (STEFENON, 2011).

Tipo *Lager*, as mais comuns e mais consumidas. A *Pilsener* ou Pilsen é uma das cervejas mais conhecidas em todo mundo. Originou-se na cidade de Pilsen em 1842, antiga Tchecoslováquia. É caracterizada por ter sabor suave, cor clara e teor alcoólico entre 4 % a 5 %. As cervejas deste grupo são fabricadas por fermentação profunda ou “baixa”, através de processo lento, geralmente em torno de 11 dias (GARCIA, 2012).

3 MATÉRIAS E MÉTODOS

Para o desenvolvimento e elaboração deste estudo, serão apresentados e discutidos a seguir os materiais, equipamentos e procedimentos necessários para o monitoramento do VDK. Os experimentos foram executados no Laboratório de análises Físico-químicas de uma indústria cervejeira da região oeste do estado do Paraná.

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Materiais para destilação

- Aparelho de destilação a vapor todo em vidro (Destilador de Parnas), com balão 500 mL de boca esmerilhada;
- Proveta de 100 mL;
- Proveta com rolha de 25 mL;
- Béker de 100 mL;
- Funil;
- Papel de filtro qualitativo;
- Cronômetro.

3.2 REAGENTES

- Ácido clorídrico 4N;
- Solução de orto-fenilenodiamina.

3.3 EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro UV-VIS marca *micronal*, com cubeta de 10 mm de quartzo;
- Manta de aquecimento;
- Balança analítica de resolução (0,0001g).

3.4 METODOLOGIA

3.4.1 Obtenção da amostra

Para esta pesquisa, foram obtidas amostras de três lotes: Fermentação / Maturação / Tanque de Pressão para análise do VDK, pH, extrato, álcool e células em suspensão. No qual as amostras foram coletadas diretamente da dorna de Fermentação/ Maturação por uma torneira, com auxílio de uma serpentina para evitar formação de muita espuma, em uma garrafa de vidro branca. As amostras foram obtidas e realizadas em duplicata durante o período da fermentação (duas amostras por dia, intervalos de 12 horas na coleta de cada amostra), na maturação da cerveja (uma amostra por dia) e no tanque de pressão em que foi retirada uma única amostra da cerveja já filtrada.

3.4.2 Preparo da amostra

As análises foram realizadas logo após a coleta das amostras. Dessa forma não foi necessário o acondicionar sob refrigeração. As amostras de fermentação/ maturação devem ser filtradas com papel filtro antes de serem destiladas. Para as amostras do tanque de pressão esse procedimento não é necessário, pois a amostra já está filtrada por se tratar de uma etapa da fabricação da cerveja.

3.4.3 Princípio do método

O método consiste em extrair as dicetonas vicinais através da destilação. A reação entre o destilado e a orto-fenilenodiamina fornece um composto, cuja absorvância medida a 335 nm é proporcional à concentração de dicetonas vicinais (livres / totais). A Convenção Europeia Brewery (EBC) recomenda o método espectrofotométrico, no qual emprega uma destilação de cerveja não decarbonatada, tratada à 70° C, sob condições controladas para obter em 5 – 10 minutos o destilado contendo dicetonas vicinais. O desenvolvimento da coloração é obtido através da reação com orto-fenilenodiamina para obtenção da 2,3 – dimetilquinoxalina, cuja absorvância medida a 335 nm é proporcional à concentração de dicetonas vicinais.

Nas condições do método também reage a 2-3 pentanodiona, contudo com menor sensibilidade.

3.4.4 Determinação do VDK

Realizou-se a montagem da aparelhagem para destilação. As amostras de fermentação / maturação, em que nelas contem levedura, devem ser clarificadas por centrifugação ou filtração. Medir 100 mL de cerveja, em temperatura de 20 ~ 5 °C, e transferir para balão de 500ml com boca esmerilhada do aparelho de destilação. Conectar o balão ao aparelho de destilação a vapor e iniciar o processo de destilação. O destilado deve ser recolhido em uma proveta de 25 mL, que deve conter 2 mL de água destilada previamente adicionada. A ponta do sistema de destilação deve estar ligeiramente imersa no líquido. Para isso, deve ser frequentemente abaixada. Quando aproximadamente 20 mL do destilado forem coletados, a ponta do sistema de destilação deve ser rinçada com água destilada.

Quando o volume atingir 25 mL, homogeneizar o destilado com movimento rotatório cuidadoso. Em seguida pipetar 10 mL do destilado para um tubo de ensaio

limpo e seco. Adicionar ao tubo de ensaio 0,5 mL de solução o-fenilenodiamina. Paralelamente, preparar um branco adicionando a um tubo de ensaio 10 mL de água destilada e 0,5 mL de solução de o-fenilenodiamina. Agitar cuidadosamente os tubos e deixar em repouso por 25 minutos, em local escuro. Adicionar 2 mL de ácido clorídrico 4N em cada tubo e homogeneizar. Mantê-los protegido da ação da luz.

Acertar o comprimento de onda do espectrofotômetro em 335 nm e realizar a leitura da absorvância da amostra e do branco antes de atingir 30 minutos da adição do HCl, zerando o aparelho com água destilada.

3.4.4.1 Apresentação dos resultados

O teor de VDK na amostra foi: $\text{VDK (mg/L)} = 2,55 \text{ (Epr-Ebr)}$

Em que: Epr = absorvância da amostra contra a água destilada.

Ebr = absorvância do branco contra a água destilada.

Expressar resultados em mg/L com duas casas decimais.

3.4.5 Determinação da temperatura

Este processo é feito a partir da medição da temperatura através de um sensor acoplado no tanque de fermentação que envia o valor a um microcontrolador que por sua vez controla um motor responsável por manter a temperatura próxima dos 13°C.

3.4.6 Determinação do pH

Realizaram-se diversas análises de pH na cerveja quando em fermentação/maturação e filtrada. Para uma completa realização da análise foi

utilizado um pHmetro marca *Mettler*, um béquer de 100 mL para homogeneizar a amostra e fazer a leitura após completa imersão do eletrodo.

3.4.7 Determinação do Extrato aparente e Álcool

O extrato aparente e o álcool das amostras de fermentação/maturação e filtrada foram determinados no equipamento *Beer Analyzer* da marca *Anton Paar*. O *Beer Analyzer* permite a análise de cerveja de vários tipos. O período de oscilação da densidade e da célula de medição da velocidade do som é medido para cada amostra. Baseados nestas medições, todos demais cálculos são feitos, como extrato original (mosto básico ou extrato primitivo), extrato aparente, álcool, extrato real, densidade, peso específico, grau real de fermentação, grau aparente de fermentação e calorias. Transferiu-se a amostra filtrada, com papel filtro e terra diatomácea (apenas para as amostras de fermentação e maturação) para o copo plástico amostrador, rinsando-o previamente com a mesma.

3.4.8 Determinação das Células em Suspensão

As células em suspensão foram determinadas por contagem do número de células viáveis e não viáveis por unidade de volume (células/mL), realizado em câmara de Neubauer em amostras de cerveja em fermentação/maturação recém homogeneizada e desgaseificadas segundo metodologia EBC (1996).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente capítulo mostra os resultados de uma fermentação/ maturação e filtração na indústria cervejeira, com o monitoramento na formação e redução do VDK, da temperatura, pH, Extrato, Álcool e Células em Suspensão durante toda a fermentação.

4.1 Fermentação

Foram monitorados três lotes, denominados de lote1, lote 2 e lote 3, pois cada lote representa uma dorna. A indústria cervejeira em que se realizou o estudo conta com 20 dornas, nelas acontecem às etapas de fermentação e maturação, em forma de processos descontínuos (batelada).

As dornas são recipientes onde ocorre a fermentação do mosto e maturação da cerveja. As dornas utilizadas pela indústria cervejeira são feitas de aço inoxidável, verticais e de até 22 metros de altura com capacidade de até 195 mil litros. São cilíndricas de diâmetro igual à metade da altura, de fundo cônico, onde na parte mais baixa se instala a canaleta de escoamento.

Para realização do monitoramento a indústria cervejeira disponibilizou para o estudo de monitoramento apenas de três dornas, devido aos altos custos para realização das análises. As análises foram realizadas nos laboratórios da própria indústria cervejeira, assim como os materiais e reagentes utilizados também foram fornecidos pela mesma.

A fermentação começa quando o a levedura é adicionada em uma dorna contendo o mosto. A levedura consome principalmente os açúcares e produz como produto principal o álcool, entretanto produz também subprodutos, entre eles o mais importante é o VDK. A Figura 6 representa os resultados encontrados de VDK, extrato, álcool e células em suspensão, do monitoramento na etapa de fermentação do Lote 1.

O tempo total de duração da fermentação para o lote 1 foram 144 horas, período em que encerrou-se a fermentação com o valor de VDK (Figura 6 [a]) 0,11 mg/L valor bem próximo do máximo permitido pela legislação para comercialização do produto.

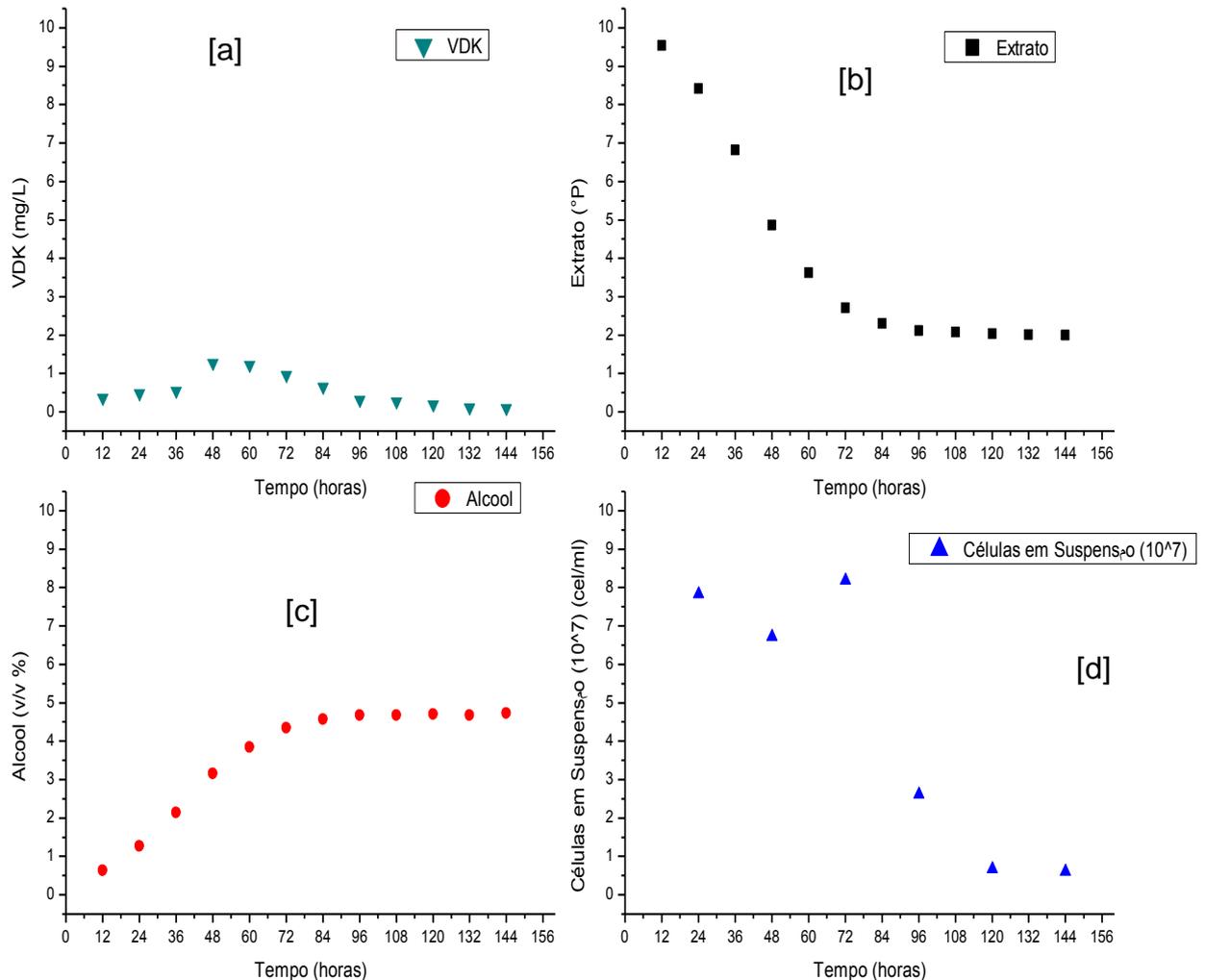


Figura 6: Resultados do monitoramento da fermentação Lote 1. [a] Concentração de VDK (mg/L) em relação ao tempo (horas), [b] Concentração de extrato (°P) em relação ao tempo (horas), [c] Concentração de Álcool (v/v %) em relação ao tempo, [d] Células em Suspensão (10⁷ células/mL) em relação ao tempo.

Na Figura 7, estão dispostos os resultados de VDK, extrato, álcool e células em suspensão, do monitoramento da etapa de fermentação do lote 2. Para esse lote

o tempo de duração foi de 144 horas, e como demonstrado na Figura 7 [a] o valor atingido foi de 0,11 mg/L, mesmo valor obtido no lote 1.

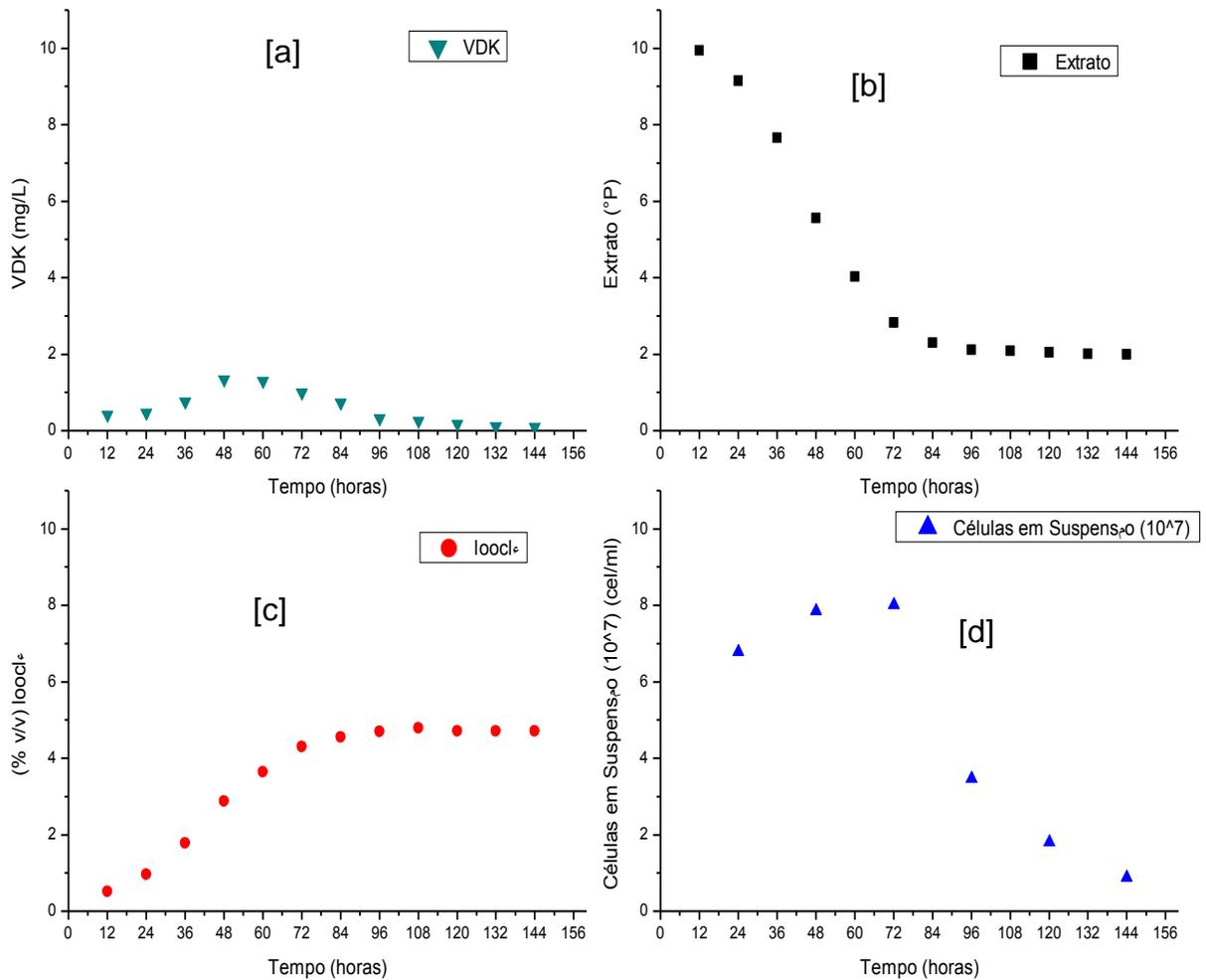


Figura 7: Resultados do monitoramento da fermentação Lote 2: [a] Concentração de VDK (mg/L) em relação ao tempo (horas), [b] Concentração de extrato (°P) em relação ao tempo (horas), [c] Concentração de Álcool (v/v %) em relação ao tempo, [d] Células em Suspensão (10^7) (células/mL) em relação ao tempo.

Na Figura 8, estão dispostos os resultados de VDK, extrato, álcool e células em suspensão, do monitoramento da etapa de fermentação do lote 3. Para esse lote o tempo de duração foi de 132 horas, em que levou 12 horas a menos para o encerramento da fermentação, o valor obtido de VDK mostrado na Figura 9 [a] 0,13 mg/L, valor de 0,02 mg/L acima do que nos lotes 1 e 2, a diferença muito pequena,

portanto valor este decorrente as 12 horas a menos de fermentação que o lote 3 foi submetido.

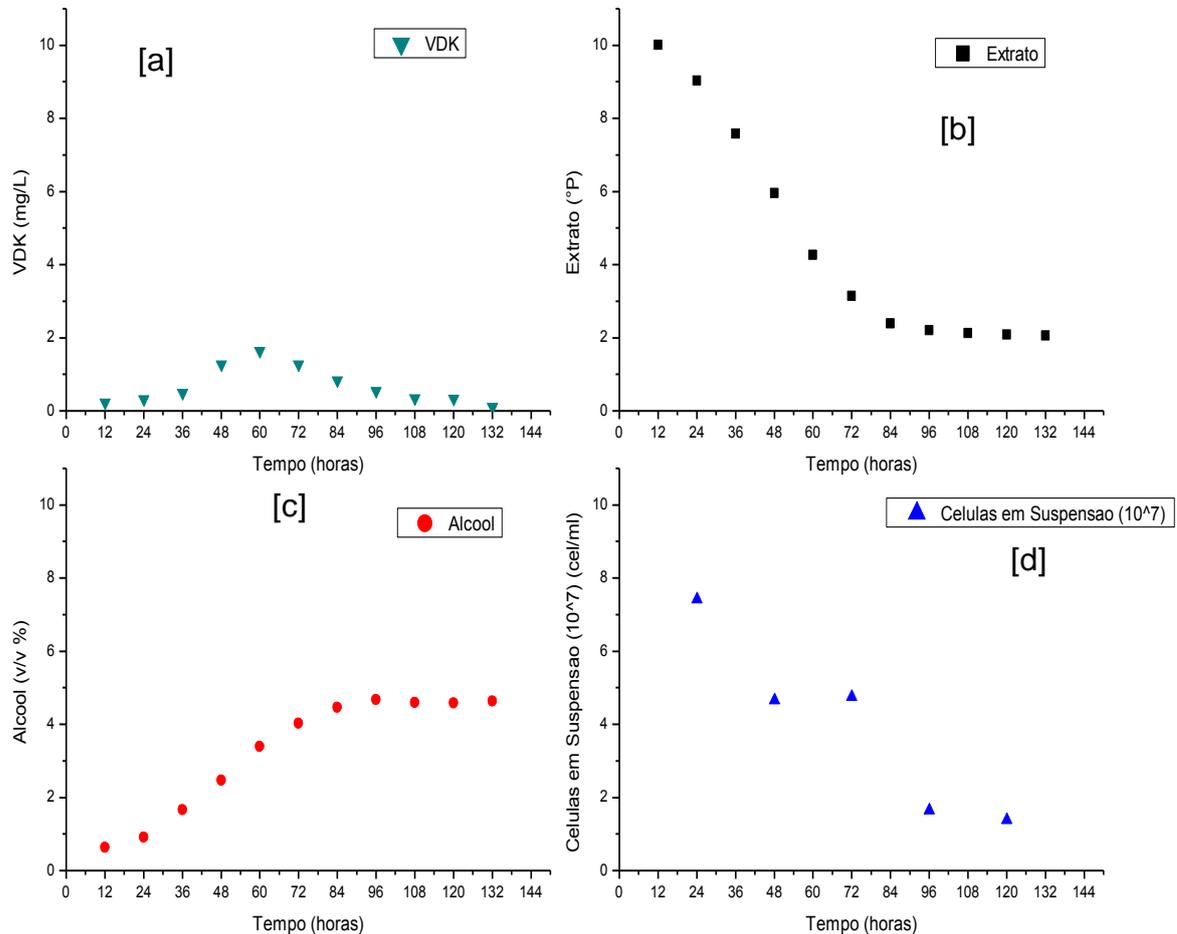


Figura 8: Resultados do monitoramento da fermentação do Lote 3: [a] Concentração de VDK (mg/L) em relação ao tempo (horas), [b] Concentração de extrato (°P) em relação ao tempo (horas), [c] Concentração de Álcool (v/v %) em relação ao tempo, [d] Células em Suspensão (10^7 células/mL) em relação ao tempo.

Nas primeiras 12 horas de fermentação realizou-se a primeira análise de VDK, em que os resultados encontrados estão demonstrados: Figura 6 [a] lote 1: 0,37 mg/L, Figura 7 [a] lote 2: 0,43 mg/L e a Figura 8 [a] lote 3: 0,24 mg/L, valores superiores a 0,10 mg/L, valor máximo permitido para comercialização do produto (cerveja).

Entretanto por se tratar das primeiras horas de fermentação, no qual o produto está em formação. Para Bergen (2006) em que realizou importante trabalho

sobre o VDK intitulado de “Diacetil”, observou que os valores iniciais da fermentação não podem ser considerados para comparação com os valores máximos permitidos pela legislação, pois encontrou valores de $\pm 0,16$ mg/L no final da fermentação, valores estes bem próximo do máximo permitido.

De acordo com o item 2.1.1.7.2 (Diacetil) na fase de fermentação do mosto cervejeiro, a levedura excreta para o meio o VDK. Esse processo bioquímico ocorre durante as vias de formação da valina e da isoleucina, que são aminoácidos fundamentais para o metabolismo da levedura (BOULTON et al., 2001).

O desempenho da formação do VDK observado nos três Lotes, o maior pico ocorreu após as 48 horas fermentação. Figura 6 [a] Lote 1: 1,29 mg/L, Figura 7 [a] Lote2: 1,35 mg/L e Figura 8 [a] Lote3: 1,66 mg/L, resultados esses estão 10 vezes acima do permitido, e 4 vezes maior dos valores encontrados nas primeiras 12 horas de fermentação, entretanto estes valores reduziram de maneira gradativa após as 60 horas de fermentação.

Com 84 horas de fermentação os valores de VDK para os três Lotes encontravam-se Figura 6 [a] Lote 1: 0,67 mg/L, Figura 7 [a] Lote2: 0,74 mg/L e Figura 8 [a] Lote3: 0,85 mg/L aproximadamente a metade do valor das 48 horas, portanto, foram necessárias 36 horas para que os valores de VDK começassem a reduzir de maneira mais significativa, isso só ocorreu, pois nas 84 horas de fermentação o nível açúcares fermentescíveis (Figuras 6 [b]: 2,31 °P, 7 [b]: 2,30 °P e 8 [b]: 2,40 °P) encontrava-se relativamente baixo, fazendo com que as leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) passassem a consumir o VDK.

Em pesquisa realizada por Carneiro (2010) em que avaliou o “Estudo Computacional da Etapa Fermentativa da Produção de Cerveja”, observou o comportamento semelhante das leveduras em absorver o VDK, em níveis de açúcares fermentescíveis baixos, no qual o autor encontrou valores de extrato em torno de $\pm 2,35$ °P.

Nas 48 horas de fermentação em que ocorreu o maior pico de formação do VDK, foram necessários 96 horas para a sua redução, deixando os valores bem próximos do permitido (máx.: 0,10 mg/L). Dessa forma a levedura levou menos tempo para produzir o VDK e mais tempo para reduzi-lo. Segundo Bergen (2006) isso ocorre, pois nas primeiras horas de fermentação o número de células em suspensão é muito maior, e no final esse número é bem reduzido.

Nas Figuras 6 [d] lote 1, 7 [d] lote 2 e a Figura 8 [d] em que estão representados os resultados das células em suspensão, obtidas a cada 24 horas, verificou-se nas primeiras 24 horas grande quantidade de células lote 1: $7,835 \times 10^7$ células/ml, lote 2: $6,791 \times 10^7$ células/ml e lote 3: $7,420 \times 10^7$ células/ml, quantidades consideradas altas para o início de uma fermentação.

Como se trata de uma fermentação industrial, a quantidade de células vivas adicionadas no mosto para iniciar a fermentação: 1,0 milhões de células/mL^{°P}, e aeração de resfriamento do mosto durante 10 horas. Isso para que haja grandes quantidades de células para iniciar a fermentação. Segundo Medeiros (2010), a presença de grandes quantidades de células em suspensão no início da fermentação é uma técnica utilizada em todas as indústrias cervejeiras para ter mais eficiência no processo.

Nas 48 horas de fermentação Figuras 6 [d] lote 1, 7[d] lote 2 e a Figura 8[d], verificou-se expressiva quantidade de células em suspensão lote 1: $8,185 \times 10^7$ células/ml, lote 2: $7,855 \times 10^7$ células/ml e lote 3: $4,665 \times 10^7$ células/ml, período em que também obteve os maiores picos de VDK, valores citados anteriormente, evidenciando que esse dois parâmetros monitorados estão diretamente relacionado, de modo que o VDK é um subproduto da fermentação, formado pelo metabolismo da levedura *Saccharomyces cerevisae*.

A expressiva quantidade de células encontradas nas 48 horas, está de acordo com dados do manual prático de cervejaria descritos por Reinold (1997), a maior concentração ($\pm 6,5 \times 10^7$ células/ml) de levedura infere no aumento da formação de VDK, entre 40 e 90 horas de fermentação.

Observa-se claramente, nas Figuras 7 [a][d] lote 1, 8 [a][d] lote 2 e a Figura 9 [a][d], após 60 horas um crescimento celular reduzido, e a formação de um menor pico de VDK. O crescimento celular, por consequência, reduziu-se a multiplicação celular/fermentação, levando um menor tempo na rota metabólica para síntese da valina pela levedura, portanto menor produção de VDK (BOULTON et al, 2001).

Nas Figuras 7 [d] lote 1, 8 [d] lote 2 e a Figura 9 [d] próximo das 130 horas o final da fermentação é caracterizado pela diminuição do extrato e pela agregação das células de levedura, que começam então a flocular. A última fase, denominada de fase estacionária, ocorre quando os agregados de células de levedura começam a acumular-se no fundo da dorna de fermentação, ou seja, sedimentam. Para

Bergen (2006) esta fase é também caracterizada pela redução do metabolismo da levedura.

O álcool também monitorado é o principal produto formado na fermentação, os resultados dos três lotes estão evidenciados nas Figuras 7 [c] lote 1, 8 [c] lote 2 e a Figura 9 [c], em que é possível verificar a curva de crescimento do álcool bastante acentuada nas primeiras horas de fermentação, e de forma mais lenta a partir das 84 horas de fermentação, período também caracterizado pela grande redução de células em suspensão, portanto ocorre a autólise das leveduras com o aumento do teor de álcool as leveduras morrem (CARVALHO & ZAMBIAZI, 2011).

O teor de álcool no final da fermentação para os Lotes 1 e 2 em torno 4,71 v/v %, já para o Lote 3 o teor de álcool encontrado 4,64 v/v %, portanto valores considerados adequados dentro dos padrões da legislação brasileira, em que o teor alcoólico varia de 3 a 8 v/v % e semelhante ao encontrado por Silva et. al (2008) em que realizou um trabalho de Elaboração de cerveja com diferentes teores alcoólicos através de processo artesanal, no qual obteve resultados de $4,8 \pm 0,4\%$ v/v, caracterizando como uma cerveja de médio teor alcoólico.

A temperatura foi uma variável monitorada e manteve-se constante durante toda à etapa de fermentação aproximadamente em 13°C, para os três Lotes monitorados, no entanto a mesma manteve-se constante por ser controlada pela indústria cervejeira, o controle da temperatura, desde o enchimento do tanque é muito importante para obtenção de uma boa curva de formação e redução do VDK no meio de fermentação (KUNZE, 1999).

A temperatura não influenciou na formação e redução do VDK, no entanto na dissertação de Sanderson et, al. (2010) que teve como tema “Controle estatístico da etapa fermentativa no processo de produção da cerveja”, a ausência de controle da temperatura, afeta diretamente no aparecimento do VDK, em que obteve no final da fermentação, nível de VDK próximo de 0,23mg/L e temperatura de 17°C.

No início da fermentação o valor do pH do Lote 1: 4,76, valor das primeiras 12 horas, reduzindo no decorrer da fermentação e de forma estabilizou permaneceu-se em pH 4 até o final da fermentação. O mesmo ocorreu para os lotes 2 e 3, início da fermentação Lote 2: pH 4,77 ; Lote 3: pH 4,81 final da fermentação pH 4 para todos os lotes. Segundo Medeiros (2010), quando o pH esta elevado próximo de 5 as células sofrem autólise e liberam maior quantidade VDK.

O pH 4 torna um meio ácido para levedura, e proporciona redução da viscosidade, e isto está correlacionado à defloculação do fermento, que atribui uma melhora da performance de fermentação. E também por ser um fator significativo para as fermentações industriais devido à sua importância tanto no controle da contaminação bacteriana quanto ao seu efeito sobre o crescimento da levedura, taxa de fermentação e formação de subprodutos (AMORIM et al., 1996; BERGEN, 2006).

Após aproximadamente 140 horas de fermentação para os três lotes, a fermentação foi encerrada atendendo as necessidades da demanda de mercado pelo produto, no qual por ser um período de baixa demanda o tempo de fermentação é mais longo (140 horas). E também por ter atingido o extrato desejado (aproximadamente 2,00 °P para os três lotes) adequado para a indústria cervejeira, portanto iniciou a etapa de maturação.

4.2 Maturação

Durante o período de maturação ocorre uma fermentação secundária e lenta na cerveja 'verde', ocasionando alterações de aroma e sabor, além de alterações em seu sistema coloidal, proporcionando a clarificação por precipitação de proteínas, leveduras e sólidos solúveis.

A maturação é conduzida a baixa temperatura, normalmente 0 °C ou próximo como nos Lotes 1, 2 e 3 em que a temperatura manteve-se em 0,5 °C. Com o abaixamento da temperatura, a levedura sedimenta depositando-se na base das cubas de fermentação, sendo possível a sua recolha para posterior utilização.

A levedura recolhida é armazenada em tanques verticais denominados tanques de estocagem. Estes tanques são arejados e agitados de forma a diminuir a ocorrência de células mortas. Após algumas sementeiras a levedura vai degenerando, sendo por isso desprezada e substituída por uma levedura propagada a partir da cultura pura. Industrialmente, a levedura é desprezada quando se encontra na sétima ou oitava geração (RODRIGUES, 2011).

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados do monitoramento da maturação para os lotes 1, 2 e 3.

Tabela 1: Resultados do monitoramento da maturação Lote1, 2 e 3: VDK (mg/L) e Células em Suspensão ($\times 10^6$) (Células/ml).

	Tempo (horas)	Média VDK	Média Células em Suspensão ($\times 10^6$)
LOTE 1	24	0,10 \pm 0,01	4,44 \pm 0,44
	48	0,09 \pm 0,01	2,80 \pm 0,14
	72	0,07 \pm 0,00	2,29 \pm 0,11
	96	0,07 \pm 0,00	2,40 \pm 0,14
LOTE 2	24	0,10 \pm 0,01	5,90 \pm 0,28
	48	0,09 \pm 0,00	5,05 \pm 0,35
	72	0,08 \pm 0,01	3,95 \pm 0,35
LOTE 3	24	0,11 \pm 0,01	4,42 \pm 0,40
	48	0,09 \pm 0,01	3,65 \pm 0,35
	72	0,08 \pm 0,00	2,20 \pm 0,14
	96	0,07 \pm 0,00	2,36 \pm 0,11

Ao final da fermentação o valor de VDK estava em 0,11 mg/L, observando a Tabela 1 foram necessárias 24 horas de maturação para que os resultados de VDK do lote 1 chegassem a 0,10 mg/L, resultado dentro do permitido pela legislação. Maturação que teve duração de 96 horas, tempo necessário para que os valores de VDK (0,07mg/L) atingisse exatamente a faixa permitida (0,07 – 0,10mg/L). Segundo Bergen (2006) a redução do VDK dependente da permanência do contato da levedura com a cerveja, portanto os valores de VDK reduziram devido à existência de pequena quantidade de células em suspensão em contato com o produto.

O mesmo aconteceu para o Lote 2 Tabela 1, em que o valor de VDK: 0,10 mg/L, contudo o tempo de maturação do Lote 2 foi menor que o Lote 1, ou seja, 24 horas a menos de maturação, todavia o resultado de VDK (0,08mg/L) já encontrava-se dentro da faixa permitida.

Para o Lote 3 em que os resultados estão dispostos também na Tabela 1, o valor de VDK (0,11mg/L) não reduziu-se nas primeiras 24 horas de maturação como aconteceu nos Lotes 1 e 2, dessa forma para esse Lote foram necessárias 48 horas de maturação para que os resultados atingissem a faixa adequada para comercialização do produto, o resultado nas 48 horas foi de 0,09 mg/L. O tempo de

duração da maturação para o Lote 3 (VDK: 0,07mg/L) foram de 96 horas mesmo tempo de duração do Lote 1.

De acordo com Carvalho (2011) em seu artigo sobre a maturação, para que ocorra a fermentação secundária (e os benefícios dela decorrentes) é necessário que a cerveja verde contenha uma contagem de leveduras na faixa de 2 a 5×10^6 células/ml. Conforme mostra Tabela 1 os resultados obtidos para contagem de células em suspensão estão bem próximos da faixa determinada pelo autor.

Para os três lotes os valores de extrato (lote 1: 2,00°P; lote 2: 1,99°P e lote 2,03 °P) , álcool (lote 1: 4,71v/v%; lote 2: 4,73 v/v% e lote 3: 4,61 v/v%) e pH (nos três lotes pH: 4) permaneceram constantes durante a maturação.

4.3 Filtração

A etapa de filtração da cerveja ocorreu 24 horas após o término da maturação, em que a filtração tem como o objetivo de remover impurezas que ainda não se decantaram, e proporcionar a limpidez final do produto, após a maturação.

Para realizar a filtração pode-se contar com diversos tipos de meio filtrante, o utilizado pela indústria cervejeira são os filtros de velas verticais, além do uso de terra diatomácea como elemento auxiliar à filtração. Ainda uma etapa final, de filtração com filtro de cartucho, para polimento.

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados do monitoramento da etapa de filtração da cerveja do Lote 1, 2 e 3.

Tabela 2: Resultados do monitoramento da filtração Lote 1,2 e 3: VDK (mg/L), Extrato (°P) e Álcool v/v%.

	Média VDK	Extrato °P	Álcool
LOTE 1	0,06 ± 0,01	1,95 ± 0,01	4,71 ± 0,01
LOTE 2	0,07 ± 0,01	1,93 ± 0,01	4,73 ± 0,03
LOTE 3	0,07 ± 0,01	1,99 ± 0,01	4,61 ± 0,02

De acordo com a Tabela 2 valor de VDK para o lote 1: 0,06 mg/L, caindo 0,01mg/L do último valor encontrado na maturação, portanto como o valor já estava dentro dos padrões da legislação não houve significativa diferença entre os valores da maturação e filtração.

O valor de pH que já estava constante no final da fermentação e maturação, permaneceu o mesmo na etapa de filtração. Única variável monitorada que apresentou uma mudança significativa nos resultados segundo a Tabela 2 para o lote 1 é o Extrato. Durante a maturação esse valor não se alterou permanecendo o mesmo do final da fermentação 2,00°P. Entretanto na filtração esse valor reduziu para 1,95°P, porém o valor de extrato atente as especificações para uma cerveja tipo pilsen em nível de extrato (1,90 – 2,30 °P).

O teor de álcool encontrado para o lote1 permaneceu em 4,71 v/v% mesmo valor encontrado na maturação, provando que na maturação não ocorreu à produção do produto. Dessa forma o teor de álcool apresentado na Tabela 2 está dentro das especificações para uma cerveja tipo pilsen, caracterizada por ter sabor suave, cor clara e teor alcoólico entre 4 % a 5 %.

Observando a Tabela 2, para o lote 2 o valor de VDK permaneceu constante, ou seja, mesmo valor encontrado na etapa de maturação. Dessa maneira, assim como ocorreu pra o Lote 1, das variáveis monitoradas a única que teve uma pequena alteração, foi para o extrato passando de 1,99 °P para 1,93 °P na etapa de filtração. De acordo com Medeiros (2010), ocorre essa redução por um provável ajuste final através de diluição com água potável.

Segundo a Tabela 2 o valor de VDK do lote 3 (0,07mg/L) permaneceu constante, ou seja, continuou o mesmo valor encontrado na etapa de maturação. Dessa maneira assim como ocorreu pra o lote 1, das variáveis monitoradas a única que teve uma pequena alteração, também foi o Extrato passando de 2,03 °P para 1,99 °P na etapa de filtração.

Após a realização das análises do monitoramento da filtração dos três lotes, continuou-se a etapa de filtração, adicionando aditivos como agentes estabilizantes, corantes ou açúcar, para o acerto final do paladar do produto. O teor de CO₂ existente na cerveja ao final do processo não é suficiente para atender as necessidades do produto. Desta forma, realiza-se uma etapa de carbonatação da mesma, por meio da injeção do gás carbônico. Além disso, eventualmente é injetado

gás nitrogênio, como intuito de favorecer características de formação de espuma (MELLO, 2001).

Após a carbonatação, a cerveja pronta é enviada para dornas específicas, denominadas “adeegas de pressão” – recipientes onde a bebida é mantida sob condições controladas de pressão e temperatura, de modo a garantir o sabor e o teor de CO₂ até o envase (GARCIA, 2012).

5 CONCLUSÃO

O monitoramento das variáveis do processo de obtenção da cerveja, com o objetivo observar a formação e redução do VDK, foram satisfatórias:

- Observou-se que, através do pH 4 por ser mais ácido além de evitar a contaminação por bactérias, também reduz os picos de VDK;

- A redução mais eficiente no pico de formação do VDK, assim com a redução da multiplicação celular, ocorreu após as 60 horas de fermentação, nos três Lotes monitorados;

- Os resultados de extrato e álcool obtidos na filtração atendem as especificações para cerveja tipo pilsen;

- Os resultados obtidos estão de acordo com o permitido pela legislação para comercialização do produto, os valores de VDK encontrados 0,07mg/L médias para os três lotes, prova que a indústria cervejeira monitorada produz cerveja tipo pilsen com qualidade.

- Esta prática (monitoramento) pode ser utilizada em qualquer cervejaria que necessite solucionar problema de qualidade (degustação do produto) e/ou atendimento da demanda do mercado, pois com a redução no tempo total de fermentação aumenta a produtividade do processo de fabricação de cerveja;

- Os resultados foram apresentados para os responsáveis pela indústria cervejeira em que monitorou-se a fermentação/maturação e filtração, no qual os resultados encontrados mostram que o produto final apresenta qualidade, pois os níveis de VDK encontrados estão aceitáveis, (abaixo de 0,10 mg /L).

- o monitoramento mostra à indústria que o processo fermentativo é eficiente, ou seja, os valores de VDK praticamente reduzem na etapa de fermentação a níveis permitidos, dessa forma a cervejaria pode verificar a possibilidade de redução do tempo total da produção de cerveja.

6. SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE DO TRABALHO

- Realizar o estudo do VDK em tempos reduzindo de fermentação.
- Realizar o estudo do VDK em tempos reduzindo o tempo de maturação.
- Avaliar o desempenho do VDK na vida de prateleira (6 meses) da cerveja processada.
- Avaliar a existência de contaminação na cerveja, e se não influencia no aparecimento do VDK.

REFERÊNCIAS

AMARO A. D. Junior, ANTONIA G. Vieira & TACIANO P. Ferreira. Processo de Produção de Cerveja. **Revista de Processos Químicos**. Faculdade de Tecnologia SENAI Roberto Mange, Anápolis, GO. Jul / Dez de 2009.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Revista de Ciências. Technol. Alim**, v. 23, n. 2, p. 121-128, 2003.

BANFORTH, C. **Beer: Tap into the Art and Science of Brewing**. 2ª Edição. Oxford University Press, 2003. V.1.

BERGEN, B.V. **Diacetyl: identification and characterisation of molecular mechanisms for reduction in yeast and their application in a novel enzyme based assay for quantification in fermentation systems**. 2006. Doctor of Philosophy. Department of Bioresource Engineering, McGill University. Montreal.

BOULTON, C. A.; BOX, W. G.; QUAIN, D. E.; MOUZAHN, S. W. **Vicinal Diketone Reduction as a Measure of Yeast Vitality**. MBAA Technical Quarterly, v. 38, n. 2, p. 89-93, 2001.

BRITES, A. A.; SANCHEZ, A.D.; J. DUE, HAMMOND, J. J. R. M.; MARTINS, P. A.; SMITH, I. **Fermentation & Maturation**. Manual of Good Practice. European Brewery Convention, 2000.

CARNEIRO, Diego Dias. **Estudo Computacional da Etapa Fermentativa da Produção de Cerveja e Proposta de Uma Estratégia de Controle para o Processo**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Tecnologia Programa de Pós-Graduação Em Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2010.

CARVALHO, Daniele Souza, ZAMBIAZI, Rui Carlos. Avaliação do Processo Fermentativo de Cerveja Pilsen Pelo Uso de Diferentes Concentrações de *Saccharomyces Cerevisiae*. **Alim. Nutr.**, Araraquara.v. 22, n. 3, p. 351-357, jul./set. 2011.

CARVALHO, Giovani Brandão Mafra, BENTO, Camila Vieira, SILVA, João Batista de A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 3º parte – A

maturação. Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena – EEL, Departamento de Biotecnologia. **Revista Analytica**. Fevereiro/Março 2007, Nº27.

CERRI, Carla Fernanda Ferreira. **Utilização de arroz preto do tipo IAC-600 (Oryza sativa) como adjunto para a produção de cerveja**. Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena (Eel–Usp). Lorena – SP. 2012.

EVANGELISTA, Rafaela Ribeiro. **Análise do Processo de Fabricação Industrial de Cerveja Faculdade de Tecnologia de Araçatuba**. Curso de Tecnologia em Biocombustíveis. Araçatuba-2012.

GARCIA, Camila Camargo. **Retórica e Cenário Microcervejeiro nas Regiões Sul/Sudeste**. Faculdade de Tecnologia de Araçatuba. Curso de Tecnologia em Biocombustíveis. Araçatuba-2012.

ISABEL, Cláudia; ALMEIDA, Rodrigues. **Métodos Espectroscópicos para o Estudo da Cerveja**. Universidade de Aveiro. Departamento de Química. 2006.

KOBAYASHI, M.; SHIMIZU, H.; SHIOYA, S. **Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation**. J. Biosci. Bioeng., v. 106, n. 4, p. 317-323, 2008.

KUNZE, W. **Tecnología para Cerveceros y Malteros**. International. Berlin: VLB, 2006. 1ª Edição em espanhol.

MEDEIROS, Claudio Dantas. **Efeito de Variáveis de Processo no Tempo de Fermentação da Cerveja e na Concentração das Diketonas Vicinais Totais (VDK)**. Dissertação de Mestrado. Natal/RN. Setembro/2010.

MELLO, Roseli Aparecida. **Produção do Bioaroma Acetoína por Hanseniaspora Guilliermondii Cct3800 através do Processo Fermentativo Batelada Alimentada**. Florianópolis- 2001.

MOLL, Manfred. **Sections on Beer and alcohol-free and low-alcohol beers**. Copyright- Lavoisier, 1991.

NAKATANI, K.; TAKAHASHI, T.; NAGAMI, K.; KUMADA, J. **Kinetic study of vicinal diketones in brewing – Formation of total vicinal diketones**. MBAA Technical Quarterly, v.21, n. 4, 1984.

OLIVEIRA, Nayara Aline Muniz. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. Universidade Federal de Minas Gerais – Ufmg Instituto de Ciências Biológicas - Icb Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Especialização em Microbiologia. Belo Horizonte – 2011.

OMURA, Fumihiko. **Targeting of mitochondrial Saccharomyces cerevisiae Iiv5p to the cytosol and its effect on vicinal diketone formation in brewing**. Springer-Verlag – 2007.

REINOLD, M. R. **Manual prático de cervejaria**. São Paulo: Aden, 1997. p. 87-100.

RODRIGUES, Cristina Tavares. **Passagem da Análise de Contagem de Células de Levedura para Autocontrole, pelo Método Sysmex**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra Junho 2011.

RODRIGUES, Pedro Miguel Gonçalves. **Desenvolvimento de Métodos Electro Analíticos para a Determinação de Biomarcadores. Diacetilo e Vitalidade de Levedura em Indústria Cervejeira e Metalotioneínas em Estudos Ambientais**. Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. PORTO – 2003.

SANDERSON, Karina; ORIENTE, Alesandra Oriente; BOLDO, Emerson Mario. **Controle estatístico da etapa fermentativa no processo de produção da cerveja**. Cascavel, v.3, n.3, p.73-84, 2010.

SANTOS, Christiane Magalhães Mello. **Avaliação da Influência do Etanol na Extração de Compostos Voláteis e Semi-Voláteis Presentes em Bebidas Alcoólicas**. Departamento de Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto -Julho – 2012.

SCHMITT, Thuísa Carla. **Produção de Cerveja Tipo Pale Ale**. BLUMENAU-2010.

SILVA A. E. et al. Elaboração de cerveja com diferentes teores alcoólicos através de processo artesanal. **Alim. Nutr.**, v. 20, n.3, p. 491-498, jul./set. 2008.

SIQUEIRA, Priscila Becker; BOLINI, Helena Maria André; MACEDO, Gabriela Alves. O Processo de Fabricação da Cerveja E Seus Efeitos na Presença de Polifenóis. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.19, n.4, p. 491-498, out./dez. 2008

STEFENON,R. **A emergência de um novo padrão de consumo e suas implicações para a dinâmica competitiva da indústria cervejeira.** 2011. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Econômicas do Setor de Ciências Aplicadas)-Faculdade de Ciências Econômicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

STWART, G. G.; RUSSELL. I. **Manual da levedura e fermentação High Gravity.** Heriot-Watt University, Ricarton, Edinburg EH 14 4AS. Scotland, 2005.

SWINDELL, S. R.; BENSON, K. H.; GRIFFIN, H. G.; RENAUL, P. T. **Genetic manipulation of the pathway for diacetyl metabolism in lactococcus lactis.** Applied and environmental microbiology, v. 62, n. 7, p. 2641–2643,1996.