

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Desenvolvimento de cervejas com baixo teor  
alcoólico com características isotônicas e perfil  
de cepas com potencial para aplicação na  
indústria cervejeira**

Deborah Oliveira De Fusco

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Alimentos e Nutrição para  
obtenção do título de Doutor em Alimentos e  
Nutrição

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique de Almeida Teixeira

Coorientadores: Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Araraquara - SP

2019

**Desenvolvimento de cervejas com baixo teor  
alcoólico com características isotônicas e perfil  
de cepas com potencial para aplicação na  
indústria cervejeira**

**Deborah Oliveira De Fusco**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
graduação em Alimentos e Nutrição para  
obtenção do título de Doutor em Alimentos e  
Nutrição

Área de Concentração: Ciência dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique de Almeida Teixeira

Coorientadores: Prof. Dr. Leonardo Lucas Madaleno

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

Araraquara - SP

2019

- 
- D993d** De Fusco, Deborah Oliveira.  
Desenvolvimento de cervejas com baixo teor alcoólico com características isotônicas e perfil de cepas com potencial para aplicação na indústria cervejeira / Deborah Oliveira De Fusco. – Araraquara: s.n., 2019.  
108 f. : il.
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Pesquisa em Ciência dos Alimentos.
- Orientador: Gustavo Henrique de Almeida Teixeira.  
Coorientador: Leonardo Lucas Madaleno.  
Coorientador: Vanildo Luiz Del Bianchi.
1. Cerveja. 2. Baixo teor alcoólico. 3. Osmolalidade. 4. *Saccharomyces*. 5. não-*Saccharomyces*. I. Teixeira, Gustavo Henrique de Almeida, orient. II. Madaleno, Leonardo Lucas, coorient. III. Del Bianchi, Vanildo Luiz, coorient. IV. Título.

## TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**GUSTAVO HENRIQUE DE ALMEIDA TEIXEIRA**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 433.480.843-34, portador da cédula de identidade RG nº 1.022.784-DF, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÊNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

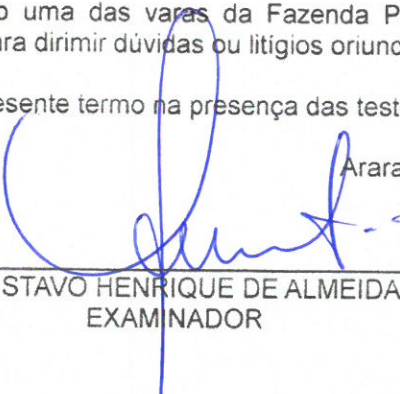
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. GUSTAVO HENRIQUE DE ALMEIDA TEIXEIRA  
EXAMINADOR

  
\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA  
Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.808-36

\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA  
Nome:  
CPF/MF:

## TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**ADRIANE ELISABETE ANTUNES DE MORAES**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 805.177.900-25, portador da cédula de identidade RG nº 1.030.728.231, doravante denominado **EXAMINADORA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma a EXAMINADORA o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** A EXAMINADORA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÉNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a EXAMINADORA tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

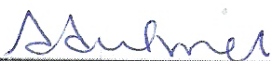
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada a EXAMINADORA.


**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. ADRIANE ELISABETE ANTUNES DE MORAES  
EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA  
Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.808-36

\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA  
Nome:  
CPF/MF:

**TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA**

**KÁTIA MARIA DA SILVA CERQUEIRA LEITE**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 138.623.968-27, portador da cédula de identidade RG nº 14.997.214, doravante denominado **EXAMINADORA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por conseqüência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma a EXAMINADORA o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** A EXAMINADORA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÊNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a EXAMINADORA tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

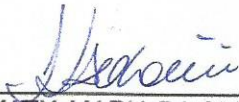
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada a EXAMINADORA.

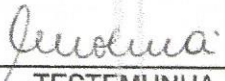
**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
PROFA. DRA. KÁTIA MARIA DA SILVA CERQUEIRA LEITE  
EXAMINADORA

  
\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA  
Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.808-36

\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA  
Nome:  
CPF/MF:

## TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**FERNANDO LUCAS PRIMO**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 046.011.076-44, portador da cédula de identidade RG nº 55.342.856-1, doravante denominado **EXAMINADOR**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o EXAMINADOR o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O EXAMINADOR compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÊNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o EXAMINADOR tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

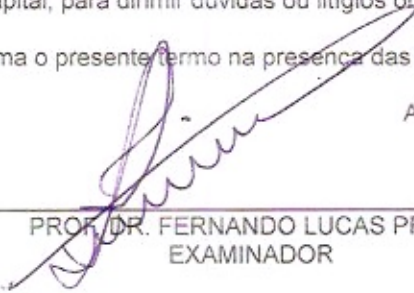
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao EXAMINADOR.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.

  
\_\_\_\_\_  
PROF. DR. FERNANDO LUCAS PRIMO  
EXAMINADOR

  
\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA

Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.808-36

\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

## TERMO DE SIGILO PARA MEMBRO DE BANCA EXAMINADORA

**JULIANA CRISTINA BASSAN**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 332.902.798-39, portador da cédula de identidade RG nº 32.717.238-1, doravante denominado **EXAMINADORA**:

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma a EXAMINADORA o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** A EXAMINADORA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÊNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a EXAMINADORA tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

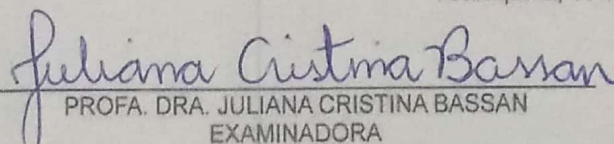
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada a EXAMINADORA.

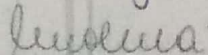
**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.

  
PROFA. DRA. JULIANA CRISTINA BASSAN  
EXAMINADORA

  
TESTEMUNHA

Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.608-36

TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

## TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

**ROSELY APARECIDA ROZATO**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 743.232.888-91, portador da cédula de identidade RG nº 5073324-2, doravante denominado **CONVIDADA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma a CONVIDADA o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** A CONVIDADA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada ""**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCÓOLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÊNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a CONVIDADA tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

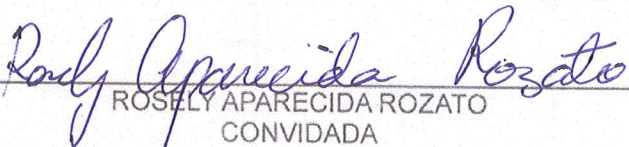
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada a CONVIDADA.

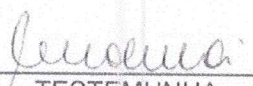
**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.

  
ROSELY APARECIDA ROZATO  
CONVIDADA

  
TESTEMUNHA  
Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.808-36

TESTEMUNHA  
Nome:  
CPF/MF:

**TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO**

**SERGIO MAURICIO DE FUSCO**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 007.902.518-84, portador da cédula de identidade RG nº 6.608.326, doravante denominado **CONVIDADO**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma o CONVIDADO o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** O CONVIDADO compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÊNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que o CONVIDADO tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

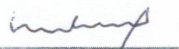
**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada ao CONVIDADO.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.



\_\_\_\_\_  
SERGIO MAURICIO DE FUSCO  
CONVIDADO



\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA  
Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.808-36

\_\_\_\_\_  
TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

## TERMO DE SIGILO PARA CONVIDADO

**MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA DE FUSCO**, nacionalidade brasileira, inscrito no CPF/MF sob nº 107.380.208-69, portador da cédula de identidade RG nº 8.398.849-X2, doravante denominado **CONVIDADA**;

Considerando que a UNESP possui política institucional que visa a proteção legal dos resultados oriundos de suas atividades de pesquisa e desenvolvimento técnico e tecnológico;

Considerando que a novidade é um dos requisitos necessários à proteção dos resultados de pesquisas pelos institutos de propriedade industrial, e, por consequência, a sua manutenção em sigilo até a adoção dos procedimentos legais pertinentes é indispensável para a obtenção da proteção almejada; e

Considerando, ainda, o disciplinado pelo ordenamento jurídico brasileiro, em especial pela Lei nº 9.279/96 (Lei de Propriedade Industrial), Lei nº 9.609/98 (Lei de Programa de Computador), Lei nº 9.610/98 (Lei de Direitos Autorais), Lei nº 10.973/04 (Lei de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 5.563, de 11 de outubro de 2005) e Lei Complementar nº 1.049/08 (Lei Paulista de Inovação, regulamentada pelo Decreto nº 54.690, de 18 de agosto de 2009);

firma a CONVIDADA o presente Termo de Sigilo, nas condições a seguir:

**CLÁUSULA PRIMEIRA.** A CONVIDADA compromete-se a manter sigilo em relação a qualquer "Informação Confidencial" a que tiver acesso no exercício de suas atividades de membro de banca examinadora constituída para análise da tese intitulada "**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÊNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA**", desenvolvida pela doutoranda **DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara-UNESP da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

**CLÁUSULA SEGUNDA.** A expressão "Informação Confidencial" abrange toda a informação relativa às pesquisas desenvolvidas no escopo da tese a que a CONVIDADA tenha acesso, sob a forma escrita, verbal ou por quaisquer outros meios de comunicação, inclusive eletrônicos.

**Parágrafo único.** Não será considerada "Informação Confidencial" aquela que estiver sob domínio público antes de ser revelada ou disponibilizada a CONVIDADA.

**CLÁUSULA TERCEIRA.** O presente termo vigorará até que os direitos de propriedade intelectual das pesquisas desenvolvidas no escopo da tese estejam devidamente protegidos junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI e junto ao Órgão competente em âmbito internacional pela UNESP.

**CLÁUSULA QUARTA.** Fica eleito uma das varas da Fazenda Pública Estadual, circunscrição judiciária de São Paulo, Capital, para dirimir dúvidas ou litígios oriundos do presente instrumento.

E para todos os efeitos, firma o presente termo na presença das testemunhas abaixo-assinadas.

Araraquara, 03 de outubro de 2019.

MARIA APARECIDA DE OLIVEIRA DE FUSCO  
CONVIDADA

TESTEMUNHA  
Nome: Cláudia Lúcia Molina  
CPF/MF: 108.957.808-36

TESTEMUNHA

Nome:  
CPF/MF:

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA TESE: DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS COM BAIXO TEOR ÁLCOOLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÔNICAS E PERFIL DE CEPAS COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA CERVEJEIRA

**AUTORA: DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO**

**ORIENTADOR: GUSTAVO HENRIQUE DE ALMEIDA TEIXEIRA**

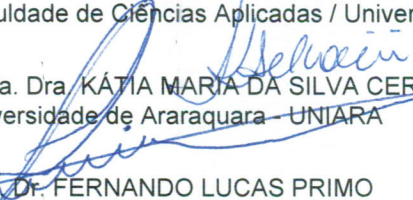
**COORIENTADOR: VANILDO LUIZ DEL BIANCHI**

**COORIENTADOR: LEONARDO LUCAS MADALENO**

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área de conhecimento: Ciência de Alimentos pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. GUSTAVO HENRIQUE DE ALMEIDA TEIXEIRA  
Departamento de Produção Vegetal - Horticultura / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. ADRIANE ELISABETE ANTUNES DE MORAES  
Faculdade de Ciências Aplicadas / Universidade Estadual de Campinas

  
Profa. Dra. KÁTIA MARIA DA SILVA CERQUEIRA LEITE  
Universidade de Araraquara - UNIARA

  
Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO  
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

  
Profa. Dra. JULIANA CRISTINA BASSAN  
Departamento de Alimentos e Nutrição / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 03 de outubro de 2019

*Aos meus pais, Cida e Sérgio e minha irmã Thais.*

## **Agradecimentos**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”.

Ao Programa de Pós-graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP *campus* Araraquara.

À Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela concessão da bolsa de doutorado.

Aos meus orientadores, Prof. Gustavo, Prof. Leonardo e Prof. Vanildo, pelo apoio e por terem tornado possível a execução deste projeto nas instalações da UNESP e FATEC.

À Faculdade de Tecnologia - FATEC “Nilo de Stefáni” em Jaboticabal por ter disponibilizado grande parte de seus laboratórios para a produção de cerveja e análises realizadas neste projeto.

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, principalmente do Programa de Alimentos e Nutrição por terem contribuído sempre com seus ensinamentos em disciplinas, sugestões e estarem disponíveis para dúvidas relacionadas a este projeto. Em especial, às professoras Daniela Cavallini e Juliana Bassan pela revisão do manuscrito apresentado no exame de qualificação, sugestões de análises complementares e suporte logístico para execução de análises em seus laboratórios.

Às professoras Patrícia de Paula e Carina Andrade do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia da UNESP em Araraquara por terem permitido, gentilmente, a execução de análises em seus laboratórios.

Aos meus pais e minha irmã, que sempre colaboraram para que a rotina e logística de meu trabalho funcionasse da melhor maneira possível.

Aos meus colegas de pós-graduação da UNESP que sempre me apoiaram e pelo tempo enriquecedor que estudamos juntos para as provas e para execução de trabalhos em grupo, especialmente à Marcela Miranda, João Paixão Neto, Ana Carolina Pires e Lívia Cirino. Também agradeço aos alunos de graduação da FATEC Jaboticabal pelo apoio operacional no laboratório, em especial aos alunos Aline Bernardo e Rafael Assis.

Aos julgadores que gentilmente participaram da análise sensorial.

Às professoras da Università degli Studi della Basilicata *campus* Potenza, Patrizia Romano e Angela Capece, que desde o princípio aceitaram prontamente minha estadia em seus laboratórios e por terem contribuído para a finalização deste projeto. Agradeço também a toda equipe do laboratório, a Rocchina Pietrafesa, aos estudantes de doutorado e estagiários por terem compartilhado seus conhecimentos e auxiliado na execução das análises.

Enfim, a todos que de alguma forma tornaram minha rotina mais leve e que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto.

Muito Obrigada!

*"Era um homem sábio aquele que inventou a cerveja."*

Platão

## Resumo

**Introdução:** O Brasil é um dos três maiores produtores de cerveja do mundo e ainda tem potencial para aumentar seu consumo principalmente em relação às cervejas de baixo teor alcoólico e sem álcool. A preocupação com as leis de trânsito e saúde incentivam a oferta desses produtos cujas vendas crescem a cada ano. **Objetivo:** Desenvolver uma cerveja de baixo teor alcoólico (< 0,5 % v/v) com características de bebida isotônica por fermentação interrompida e comparar esta cerveja a bebidas já comercializadas (bebida isotônica, cerveja convencional, cervejas 0,0% de álcool e cerveja de baixo teor alcoólico isotônica). Além disso, avaliar o potencial de leveduras não *Saccharomyces* em fermentações mistas com *Saccharomyces* para a produção de cervejas de baixo teor alcoólico. **Métodos:** Foram avaliados para os oito grupos de bebidas: pH, teor de sólidos solúveis (%), teor alcoólico (% v/v), acidez total titulável (mEq.L<sup>-1</sup>), osmolalidade (mOsmol.kg<sup>-1</sup>), amargor (IBU), cor (EBC) índice de compostos fenólicos totais (mg ácido gálico.L<sup>-1</sup>), açúcares redutores e totais (%) e teores de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (g.L<sup>-1</sup>). Para a cerveja desenvolvida, foram avaliadas viabilidade celular de *S. cerevisiae* e contagem global de microrganismos em meio PCA. A análise sensorial foi realizada pelo teste de aceitação e intenção de compra, com a avaliação de mais duas marcas de cervejas do tipo 0,0%. Já para a avaliação do perfil de leveduras *Saccharomyces* e não *Saccharomyces*, foram executadas análises de habilidade fermentativa em glicose e maltose, catalase e estresse oxidativo em presença de peróxido. Fermentações mistas foram conduzidas em mosto tipo 'Pilsen' e os teores de sólidos solúveis (%), etanol (% v/v) e metabólitos secundários (mg.L<sup>-1</sup>) avaliados para cada um dos grupos antes e após a refermentação em garrafa. **Resultados:** As cervejas de baixo teor alcoólico do tipo isotônica desenvolvida e de marca alemã, são produtos que em geral diferem das bebidas isotônicas em relação aos parâmetro físico-químicos, porém, apresentaram características mais próximas às bebidas isotônicas que a cerveja convencional e cervejas do tipo 0,0 % comercializadas no Brasil. Todas as cervejas apresentam compostos fenólicos que apresentam

propriedades antioxidantes e benefícios á saúde. Esses benefícios estariam ausentes nas bebidas isotônicas visto que são destinadas exclusivamente a hidratação e não possuem compostos fenólicos em sua composição. Quanto aos aspectos sensoriais, todas as cervejas tiveram em geral boa aceitação por parte dos julgadores. A adição de sais à formulação da cerveja isotônica produzida não interferiu na aceitação do produto. Já as leveduras não convencionais, quando empregadas em fermentações mistas com *Saccharomyces* podem ser uma opção à produção de cervejas de baixo teor alcoólico, visto que o equipamento para a produção pode ser o mesmo já utilizado para a cerveja tradicional e o teor alcoólico é inferior àquele presente em cervejas convencionais de mercado. **Conclusão:** Verificam-se que as abordagens biológicas, ou seja, fermentação interrompida, alteração das condições de mosturação ou utilização de leveduras não convencionais são opções viáveis para a produção de cervejas de baixo teor alcoólico (< 3% v/v). Assim, visto que as leveduras não convencionais tenham sido mais exploradas no campo de vinhos, mais estudos em mostos cervejeiros são necessários antes de sua aplicação tecnológica em grande escala.

**Palavras-chave:** cerveja, baixo teor alcoólico, osmolalidade, *Saccharomyces*, não-*Saccharomyces*.

## Abstract

**Introduction:** Brazil is one of the three largest beer producers in the world and still has potential to increase its consumption mainly in relation to the low alcohol and non-alcoholic beers. The concern about the traffic laws and a healthy lifestyle encourage the supply of these products whose sales grow each year. **Objective:** Developing a low alcohol beer (< 0.5% v/v) by interrupted fermentation with isotonic characteristics and to compare it with commercialized beverages (sports drinks, regular beer, alcohol-free and low alcohol isotonic beers). Also, evaluating the potential of non-*Saccharomyces* yeasts for their use as starters in co-fermentation with *Saccharomyces* for the production of low-alcohol beers. **Methods:** The quality parameters were evaluated for the eight groups of beverages: pH, soluble solids content (%), alcohol content (% v/v), total acidity titratable (mEq.L<sup>-1</sup>), osmolality (mOsmol.kg<sup>-1</sup>), bitterness (IBU), color (EBC), phenolic compounds (mg. gallic acid L<sup>-1</sup>) total and reducing sugars (%) and Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> (g.L<sup>-1</sup>) contents. *S. cerevisiae* viability and total aerobic bacterial count were evaluated for developed batches. Sensory analysis was performed by the acceptance test and purchase intention along with the evaluation of two more alcohol-free brands beers. For the screening of the *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts, fermentative ability in glucose and maltose, catalase and oxidative stress in the presence of peroxide were performed. Mixed fermentations were conducted in 'Pilsen' wort and evaluated for soluble solids content (%), ethanol content (% v/v) and secondary metabolites (mg.L<sup>-1</sup>) before and after the refermentation in the bottle. **Results:** Both, developed and German non-alcoholic beers are products that generally differ from the sports drinks in relation to physical-chemical parameters. However, they presented characteristics that are closer to the sports drinks than the regular and alcohol-free beer marketed in Brazil. All beers have phenolic compounds that present antioxidant properties and health benefits. These benefits are absent in the sports drinks since these are exclusively destined to hydration and do not have phenolic compounds in their composition. As for the sensorial aspects, all the beers were generally well accepted by the judges

and the addition of salts to the formulation of the developed isotonic beer did not interfere in the acceptance of the product. Non-*Saccharomyces* yeasts may be an option in the production of low-alcohol beers, since the equipment is the same of the traditional beer production and the alcohol content is lower than that found in conventional beers. **Conclusion:** Biological approaches as interrupted fermentation, change in the fermentation parameters or use of non-conventional yeasts, are viable options for the production of low-alcohol beers (< 3% v/v). As non-conventional yeasts were more explored in wine production, more studies are required to apply such technology in brewing large scale.

**Keywords:** beer, low alcohol, osmolality, *Saccharomyces*, non-*Saccharomyces*.

## Sumário

1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	4
<b>2.1 CERVEJA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2 EXERCÍCIO FÍSICO E CONSUMO DE BEBIDAS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.3 REPOSITORES HIDROELETROLÍTICOS .....</b>	<b>6</b>
2.3.1 Sódio (Na <sup>+</sup> ).....	7
2.3.2 Potássio (K <sup>+</sup> ) .....	7
<b>2.4 INOCUIDADE DA CERVEJA DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO .....</b>	<b>8</b>
<b>2.5 PRODUÇÃO DE CERVEJA DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO .....</b>	<b>9</b>
<b>2.6 LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS .....</b>	<b>10</b>
3 PROPOSIÇÃO .....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	13
<b>4.1 DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO .....</b>	<b>13</b>
<b>4.2 TESTE COMPARATIVO COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE BEBIDAS .....</b>	<b>16</b>
<b>4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS .....</b>	<b>17</b>
4.4.1 pH .....	18
4.4.2 Determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST).....	18
4.4.3 Teor alcoólico .....	18
4.4.4 Osmolalidade .....	18
4.4.5 Cor .....	19
4.4.6 Amargor .....	19
4.4.7 Determinação de acidez total titulável (ATT) .....	20
4.4.8 Determinação do teor de açúcares redutores e totais.....	20
4.4.9 Compostos fenólicos - Índice de polifenóis totais .....	20
4.4.10 Determinação do teor de sódio (Na <sup>+</sup> ) e potássio (K <sup>+</sup> ) .....	21
<b>4.5 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS .....</b>	<b>21</b>
4.5.1 Contagem global de microrganismos .....	21
4.5.2 Viabilidade celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pelo método de azul de metileno básico (Ringer) .....	22
<b>4.6 ANÁLISE SENSORIAL .....</b>	<b>22</b>
<b>4.7 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO TECNOLÓGICA EM CERVEJAS .....</b>	<b>23</b>
4.7.1 Avaliação da capacidade fermentativa das leveduras .....	24
4.7.2 Atividade da catalase .....	24

4.7.3 Tolerância ao estresse oxidativo .....	24
4.7.4 Extração de DNA.....	25
4.7.5 Amplificação de DNA e primers.....	25
4.7.6 Fermentação em escala de laboratório com culturas mistas .....	26
4.7.7 Avaliação da viabilidade celular em meio ágar nutriente WL .....	27
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJAS DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO .....</b>	<b>28</b>
<b>5.2 COMPARAÇÃO COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE BEBIDAS.....</b>	<b>37</b>
<b>5.3 ANÁLISE DE CLUSTERS.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4 ANÁLISE SENSORIAL .....</b>	<b>50</b>
5.4.1 Teste de Aceitação.....	50
5.4.2. Intenção de compra.....	52
<b>6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CEPAS <i>Saccharomyces</i> E NÃO- <i>Saccharomyces</i> COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE CERVEJAS DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO .....</b>	<b>53</b>
<b>7 FERMENTAÇÃO EM ESCALA DE LABORATÓRIO COM CULTURAS MISTAS</b>	<b>58</b>
<b>8 CONCLUSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO I: Desenvolvimento da cerveja de baixo teor alcoólico– lotes piloto ...</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATT: Acidez total titulável

EBC: *European Brewery Convention*

IBU: *International Bitterness Units*

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PCA: *Plate count agar*

PIB: Produto interno bruto

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

SCF: *Scientific Committee on Food*

SRM: *Standard Research Method*

SST: Sólidos solúveis totais

STJ: Superior Tribunal de Justiça

YPD: *Yeast extract peptone dextrose*

## 1 INTRODUÇÃO

A cerveja é a bebida resultante da fermentação a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção, adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, segundo a definição do Decreto 9.902 de 8 de julho de 2019 que trata de alterações do Decreto 6.871 de 4 de junho de 2009 (1). Outras variações, tais como a adição de adjuntos de malte que são comuns em cervejas vendidas no Brasil, também estão previstas nestes Decretos e sua produção é regulamentada no país pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O Brasil encontra-se entre os três maiores produtores de cerveja no mundo (14 bilhões de litros por ano), sendo os dois principais produtores a China (48,9 bilhões de litros por ano) e os Estados Unidos (22,5 bilhões de litros por ano). O faturamento da indústria cervejeira no Brasil é de cerca de 77 bilhões/ano e constitui 1,6 % do produto interno bruto (PIB). Além disso, o Brasil ocupa a 24<sup>o</sup> posição com um volume consumido anualmente de 68 litros de cerveja por pessoa. Tendo em vista que a República Tcheca (147 litros por pessoa/ano), a Áustria (106 litros por pessoa/ano) e a Alemanha (102 litros por pessoa/ano) apresentam consumo superior ao do Brasil, estas diferenças configuram um indicativo de que há um potencial de crescimento para o consumo de cerveja para os próximos anos (2).

Dentre os vários segmentos da indústria cervejeira, o mercado de cerveja sem álcool tem crescido nos últimos anos, principalmente devido às restrições estabelecidas pelas leis de trânsito e a busca por um estilo de vida mais saudável. Embora em expansão, o consumo nacional dessa bebida ainda é pequeno. Em países como a Espanha e os EUA, este segmento já é reconhecido e consolidado, representando até 18% do mercado total de cerveja (2). De 2011 a 2016, houve crescimento de 20% no mercado mundial de cervejas sem álcool e há previsão que até 2021 este possa crescer mais 24% (3).

Na maioria dos países da Europa e EUA, as cervejas do tipo sem álcool devem apresentar menos de 0,5% (v/v) de etanol (4). No Brasil, devido a uma decisão do Superior Tribunal de Justiça (STJ) em 2016, as cervejas sem álcool

não podem mais ser rotuladas com os termos “sem álcool”, já que podem conter até 0,5% (v/v) de etanol. Portanto, tais produtos devem ser classificados no Brasil como de “baixo teor alcoólico” (5),

Na Alemanha, algumas cervejas de baixo teor alcoólico são associadas ao termo “isotônico” (6), sendo que as bebidas esportivas isotônicas são geralmente utilizadas durante ou após o exercício físico para evitar ou retardar a depleção dos estoques de carboidratos do organismo e/ou aparecimento da desidratação (7,8).

De acordo com o Comitê Científico de Alimentos da Comissão Européia (*Scientific Committee on Food* - SCF), as bebidas destinadas a recompensar o esforço físico, tais como as isotônicas, devem ser formuladas com osmolalidade entre 270 e 330 mOsmol.kg<sup>-1</sup> (9). Já no Brasil, é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 18 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), de 27 de abril de 2010 (10), que dispõe sobre alimentos para atletas, o que inclui as bebidas isotônicas ou suplementos eletrolíticos. Segundo esta RDC, a concentração de sódio (Na) nestes tipos de produtos deve estar entre 460 e 1150 mg.L<sup>-1</sup> e devem ser utilizados sais inorgânicos para fins alimentícios como fonte de sódio. Em relação à osmolalidade, esta deve ser inferior a 330 mOsmol.kg<sup>-1</sup>, porém quando designado o termo “isotônico” no rótulo, a osmolalidade deve estar na faixa de 270 a 330 mOsmol.kg<sup>-1</sup>. Os carboidratos podem constituir até 8 % (m/v) do produto, desde que não sejam amidos e polióis e que o teor de frutose seja de no máximo 3 % (m/v). O produto pode ser adicionado de vitaminas e minerais, (10) e pode ser adicionado de potássio (K) em até 700 mg. L<sup>-1</sup>. No entanto, não podem ser adicionadas fibras alimentares.

A preocupação com a hidratação mais adequada durante as atividades físicas se faz necessária, pois em atividades com até 60 minutos de duração, a água é a bebida mais adequada para a reposição hídrica, porém quando as atividades são superiores a 60 minutos, a utilização de bebidas que contenham carboidratos passa a ter uma importância considerável (11). Ao se hidratar exclusivamente com água, os atletas apenas mantem seus estoques hídricos próximos da normalidade, mas quando fazem uso de bebidas isotônicas, além de restaurar os estoques hídricos, armazenam uma quantidade extra de

carboidrato para ser utilizado durante a atividade física. Isso evita quadros de hipoglicemia e acelera a recuperação do glicogênio muscular (12,13).

Tradicionalmente, as bebidas isotônicas têm sido preparadas utilizando-se de corantes e aromatizantes artificiais, além de conservadores. Como há um interesse crescente em relação a novos alimentos e bebidas que possam promover a manutenção da saúde, isso tem incentivado o desenvolvimento de novas formulações de bebidas não alcoólicas que sejam fontes de nutrientes e compostos bioativos. Além destas características, os aspectos sensoriais também são relevantes, pois apresentam impacto significativo na aceitabilidade do produto pelo consumidor (14).

Neste contexto, insere-se o presente trabalho que visa produzir uma cerveja de baixo teor alcoólico ( $< 0,5\% \text{ v/v}$ ) com características de bebida isotônica utilizando-se fermentação interrompida. Além disso, avaliar se as leveduras não *Saccharomyces* em fermentações mistas com leveduras *Saccharomyces* são adequadas para a produção de cervejas de baixo teor alcoólico ( $< 3,0\% \text{ v/v}$ ).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 CERVEJA**

A produção de cerveja é uma atividade que coincide com os primórdios da urbanização e civilização e esteve amplamente difundida desde as sociedades mais antigas às sociedades de hoje. A cerveja, assim como outras bebidas alcoólicas desempenhavam funções importantes nas sociedades, sobretudo em cultos e medicina no antigo Egito, por exemplo. Não há dúvidas que os processos, contextos, assim como ingredientes mudaram no decorrer da história, no entanto, o processo de industrialização criou pré-requisitos para a produção de cerveja mundialmente (15). Diante da alta popularidade desta bebida e também da conscientização da diminuição do consumo de álcool nos últimos anos, verificou-se um aumento da oferta de cervejas sem álcool ou de baixo teor alcoólico no mercado mundial, também para o segmento de produtos esportivos (6).

Nos jogos olímpicos de inverno de 2018, boa parte dos atletas alemães consumiram cerveja do tipo sem álcool ou de baixo teor alcoólico e o sucesso dos mesmos entre muitos fatores, também foi atribuído ao uso deste tipo de produto durante os treinos (16). Embora ainda não haja nenhuma comprovação científica sobre este assunto, outra pesquisa (17), relata que corredores que ingeriram cerveja sem álcool ou de baixo teor alcoólico em uma maratona sofriam menos inflamação e problemas respiratórios nas vias superiores depois da corrida que atletas que ingeriram placebo em estudo duplo cego. Assim, a cerveja proporcionou uma recuperação mais rápida a estes atletas e isso foi atribuído aos polifenóis presentes na mesma.

### **2.2 EXERCÍCIO FÍSICO E CONSUMO DE BEBIDAS**

Durante o exercício físico, muitas vezes a produção de suor pode exceder a ingestão de líquidos ocasionando um déficit de fluido ou hipohidratação. Para isso, antes de seguir o treinamento, se faz necessário a restauração de fluidos e eletrólitos perdidos por meio da ingestão de bebidas que os contenham (18). A hipohidratação pode prejudicar o desempenho,

principalmente em exercícios de alta intensidade, resistência (19), habilidades motoras aplicadas (20) e de desempenho cognitivo (21), principalmente quando o nível de hipohidratação é superior a 2 % da massa corporal. A reidratação completa após o exercício ocorre quando o indivíduo consome uma bebida enriquecida com sódio (Na) que contenha cerca de 25 mmol.L<sup>-1</sup> em um volume superior ao volume de suor perdido durante o exercício (22,23). Evidências apontam que conforme a concentração de eletrólitos é aumentada, principalmente a de Na, aumenta também o potencial de reidratação da bebida (24,25,26).

Em alguns países, os atletas tem por hábito, dentro da cultura desportiva, consumir cerveja como parte da celebração (27,28). Isso pode influenciar a restauração dos líquidos perdidos durante a atividade física já que em quantidades medianas o consumo de cerveja pode até colaborar para a reposição de líquidos. No entanto, há poucos estudos em relação ao consumo de grandes quantidades desta bebida e seus efeitos para a reposição de líquidos pós atividade física.

Embora o álcool tenha efeito diurético (29), nas cervejas de baixo teor alcoólico [1 % ou 2 % (v/v)] ou em cervejas de até 0,5 % (v/v), foi verificado um potencial de reidratação semelhante (30). Por outro lado, cervejas com 4 % (v/v) de álcool parecem atrasar a recuperação e aumentar as perdas urinárias (31). Além disso, se o corpo está hipohidratado, o efeito diurético de 1 L de cerveja a 4 % (v/v) é menor que o efeito observado quando o corpo está completamente reidratado (32). Portanto, verifica-se que o efeito diurético do álcool é menos pronunciado no quadro de hipohidratação induzida pela atividade física e que a porcentagem de álcool na cerveja influencia o potencial de reidratação da bebida (30).

Em estudo realizado com alteração da osmolalidade de cervejas comerciais (30), diferenças significativas nos parâmetros dos voluntários avaliados foram encontradas em relação às convencionais de teor alcoólico correspondente a 4,8 % (v/v), baixo teor alcoólico 2,3 % (v/v), convencional [4,8 % (v/v)] acrescida de 25 mmol.L<sup>-1</sup> de Na e de baixo teor alcoólico [2,3% (v/v)] acrescida de 25 mmol.L<sup>-1</sup> de Na. Após 1 h de exercícios, foram avaliados os parâmetros de equilíbrio dos fluidos, produção de urina, concentração de álcool e tolerância gastrointestinal por um período total de 5 h. Quanto à produção de

urina, a cerveja de baixo teor alcoólico acrescida de 25 mmol.L<sup>-1</sup> de Na foi a que induziu a uma menor produção urinária no período total de 5 h sendo que houve diferença estatística significativa quando comparada à cerveja convencional e convencional acrescida de 25 mmol.L<sup>-1</sup> de Na. Outros resultados do mesmo estudo indicam que a cerveja de baixo teor alcoólico acrescida de Na parece induzir mais a conservação dos fluidos que a mesma quantidade de Na adicionada à cerveja convencional [4,8% (v/v)]. Desta forma, tal como proposto no presente estudo, o desenvolvimento de uma bebida com teor alcoólico inferior a 0,5 % poderia contribuir para a manutenção dos fluidos corporais. Embora não esteja elucidado o mecanismo dose-dependente do Na em bebidas de baixo teor alcoólico, verificam-se muitos temas com potencial de estudo neste campo, principalmente devido ao alto consumo da cerveja por pessoas que praticam atividades físicas (30).

### 2.3 REPOSITORES HIDROELETROLÍTICOS

Em situação de treinamento a ingestão de água foi comparada à de outras bebidas esportivas. O valor energético das bebidas esportivas foi informado aos participantes (6,8 % de carboidratos com 27 kcal. 100g<sup>-1</sup> ou 1 % de carboidratos com 4 kcal.100g<sup>-1</sup>) e esta informação não afetou o consumo das mesmas. Os resultados indicaram que as bebidas esportivas com sabor agradável, apesar de seu conteúdo calórico, conduzem a um maior consumo de líquidos e a um melhor balanço hídrico em relação ao consumo de água (33).

Em outro estudo com atletas de ambos os sexos, o Na foi oferecido em cápsulas após 90 minutos de exercícios intensos. Os resultados indicaram que a preferência pelo sabor salgado foi condicionada a reposição de Na, sendo esta, por sua vez, diretamente proporcional à quantidade de suor perdido nos exercícios (34). Por outro lado, voluntários avaliados após 120 minutos de atividade física, relataram sentir a sensação de maior plenitude gástrica quando ingeriram água em relação aos repositores hidroeletrólíticos comerciais. No entanto, permaneceram com mais sede ao ingerirem água em comparação com os repositores (35).

### **2.3.1 Sódio ( $\text{Na}^+$ )**

O *American College of Sports Medicine* (18) recomenda, para exercícios com duração maior que 60 minutos, a adição de eletrólitos, preferencialmente cloreto de sódio ( $0,5$  a  $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ ) à água para repor as perdas de sódio ( $\text{Na}$ ) pelo suor e evitar a hiponatremia (36).

A concentração de  $\text{Na}^+$  no suor varia de  $413$  a  $1091 \text{ mg.L}^{-1}$ . Outros minerais, como o potássio ( $\text{K}$ ), cálcio ( $\text{Ca}$ ) e magnésio ( $\text{Mg}$ ) são considerados de pouca representatividade em comparação ao  $\text{Na}$ , já que a reidratação com grandes quantidades de água pode, em exercícios intensos e em altas temperaturas, resultar em hiponatremia ( $< 135 \text{ mmol.L}^{-1}$ ), mas não em hipocalemia ou hipomagnesemia (7).

A adição de  $\text{Na}$  às bebidas repositoras hidroeletrólíticas não representa um problema para a saúde dos praticantes de atividades físicas e indivíduos sem restrição alimentar, pois estes produtos tem em média  $90 \text{ mg}$  de sódio em  $200 \text{ mL}$  de bebida, ou seja, cerca da mesma concentração encontrada no leite de vaca cru (37).

A utilização de outros sais sódicos permitidos pela legislação é indicada para melhorar a palatabilidade dos produtos. A adição de cloreto de sódio, como única fonte de sódio, confere sabor salgado ao produto. Na formulação de uma bebida similar à água de coco, foi necessário adicionar, além do cloreto de sódio, o citrato de sódio e o fosfato monobásico de sódio, para evitar a rejeição do produto em função do seu sabor salgado (38).

O uso do bicarbonato de sódio em repositores hidroeletrólíticos já foi proposto como fonte de  $\text{Na}$ . Entretanto, alguns efeitos colaterais indesejados ocorreram, por exemplo, náusea e diarreia. A inclusão de citrato de sódio na formulação de bebidas torna-se mais interessante do que a do bicarbonato de sódio, pois este tem efeito tampão semelhante (regulador de acidez) e não apresenta efeitos indesejados (39).

### **2.3.2 Potássio ( $\text{K}^+$ )**

O potássio ( $\text{K}$ ) na forma iônica ( $\text{K}^+$ ) é um dos íons mais abundantes nos fluidos intracelulares e, assim como o  $\text{Na}^+$ , está muitas vezes combinado ao

cloro (Cl<sup>-</sup>) e também contribui para a manutenção da pressão osmótica e balanço ácido-básico. É indicada a inclusão de baixos teores de K nas bebidas consumidas após sudorese intensa visando aumentar a retenção de água no espaço intracelular (8). O K proveniente das frutas e hortaliças também é desejável, pois encontra-se geralmente ligado ao citrato, que pela ação tamponante, ajuda a proteger os ossos da desmineralização induzida por ácidos (40).

#### 2.4 INOCUIDADE DA CERVEJA DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO

Quando se trata da inocuidade da cerveja de baixo teor alcoólico, trabalhos com lactantes são os mais comumente encontrados na literatura. Em estudo realizado com a ingestão de pelo menos 1,5 L de cerveja de baixo teor alcoólico [0,4 % (v/v)], foram encontrados somente traços de álcool (máximo de 0,0021 g.L<sup>-1</sup>) em amostras de leite materno adquiridas imediatamente após a ingestão da bebida. Da mesma forma, em amostras adquiridas com mais de uma hora, não se verificou a presença de álcool no leite materno (41).

A avaliação da suplementação da dieta materna com cerveja de baixo teor alcoólico e seu efeito sobre as propriedades antioxidantes no leite humano foi avaliada em um trabalho espanhol (42). A legislação espanhola difere da brasileira ao permitir que a cerveja sem álcool possa conter até 1 % de álcool (v/v). Durante um mês, as lactantes ingeriram diariamente 660 mL (2 latas) de cerveja de baixo teor alcoólico com 0,7 % de álcool (v/v). Verificou-se que houve aumento da atividade e conteúdo antioxidante do leite materno durante o período em que as voluntárias fizeram ingestão da bebida. Conseqüentemente, os danos produzidos pelo estresse oxidativo em recém-nascidos foram diminuídos. Isso indica que a cerveja, além de inócua à saúde humana, pode proporcionar benefícios por suas propriedades antioxidantes e da mesma forma, apresenta-se como uma bebida segura para atletas que a consomem como no contexto do presente trabalho.

## 2.5 PRODUÇÃO DE CERVEJA DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO

As cervejas sem álcool ou com baixo teor alcoólico podem ser produzidas por vários métodos e estes podem ser divididos em dois grupos principais: os físicos e os biológicos (43).

Os chamados métodos físicos são baseados na remoção do álcool da cerveja produzida de maneira convencional e requerem investimentos consideráveis em equipamentos especiais. Após o processo de remoção do álcool, a qualidade sensorial da cerveja produzida geralmente é boa (43).

As abordagens biológicas mais difundidas são baseadas na formação limitada de etanol durante a fermentação do mosto cervejeiro. Para isso, geralmente são utilizados equipamentos comumente empregados para a produção de cervejas tradicionais e, portanto, não há necessidade de investimentos adicionais. Todavia, o emprego desta abordagem pode levar a formação de compostos de aroma desagradáveis. A utilização de leveduras especiais ou microrganismos selecionados podem contribuir significativamente para melhorar a qualidade sensorial do produto (43).

Existem também processos de produção do tipo fermentação contínua com levedura imobilizada com base na formação de álcool limitado que requer equipamento e material especial, biorreatores de operação contínua e suporte para imobilização das células. Neste processo, os custos de investimento mais elevados tem que ser justificados pela maior produtividade de processos contínuos (43).

Os métodos para produção de cerveja sem álcool ou de baixo teor alcoólico baseados no controle da formação de álcool podem ser classificados de acordo com o equipamento necessário e subdivididos naqueles que requerem alterações tecnológicas ou leveduras especiais. O processo mais explorado é aquele que utiliza a planta de uma cervejaria comum, enquanto a fermentação contínua é uma tecnologia promissora, porém ainda pouco utilizada. Assim, os procedimentos aplicados neste projeto visam simular a produção utilizando-se equipamento e material de cervejaria tipo tradicional (43).

No presente trabalho, foi empregada a fermentação interrompida para produção de cervejas com baixo teor de etanol (0,5% v/v) com características

isotônicas e posteriormente o emprego de leveduras não convencionais para produção de cervejas de baixo teor alcoólico (< 3 % v/v). Ambos os processos não necessitam o emprego de equipamentos especiais sendo possível executar a produção com os mesmos equipamentos utilizados para cervejas convencionais.

## 2.6 LEVEDURAS NÃO CONVENCIONAIS

As leveduras utilizadas para a produção de cerveja são normalmente do gênero *Saccharomyces* e podem ser tradicionalmente divididas em dois grupos: *ale* e *lager*, também conhecidas como leveduras de alta e baixa fermentação, respectivamente. Originalmente, essas cepas foram classificadas com base em suas propriedades de floculação. Além disso, esses dois tipos de leveduras fermentadoras diferenciam-se também com base no crescimento e temperatura de fermentação. A temperatura que mais favorece o crescimento e fermentação de leveduras *lager* encontra-se na faixa de 4 a 12 °C, enquanto que para leveduras de fermentação *ale*, as temperaturas variam entre 14 a 25°C (44).

A crescente demanda por produtos inovadores, de sabores alternativos e de cervejas com baixo teor de álcool estimula a pesquisa sobre os benefícios de leveduras não convencionais. Espécies que não pertencem ao gênero *Saccharomyces* foram isoladas e caracterizadas para o desenvolvimento de cervejas especiais (45). Leveduras selvagens e estirpes de leveduras não *Saccharomyces* não domesticadas podem fornecer características diferentes com relação ao aroma e sabor que resultam em novas variações e estilos de cerveja. No entanto, uma vez que as leveduras não *Saccharomyces* representam cepas não domesticadas, suas características de fermentação tem uma variação maior que as *Saccharomyces* e impactam diretamente na qualidade das cervejas produzidas e, assim, constituem um campo a ser explorado pelos cervejeiros. Atualmente, o uso dessas espécies não convencionais como leveduras alternativas no processo fermentativo ainda é limitado. Geralmente, assumem-se que as leveduras não *Saccharomyces* desempenham função negativa no processo de fermentação em consequência de alguns defeitos encontrados nas cervejas com relação a turbidez, filtrabilidade, viscosidade, *off-flavors*, acidez e outras alterações no sabor (44).

Assim, estes microrganismos foram mais introduzidos na indústria vinícola, já que estas leveduras são um componente comum da microbiota que se desenvolve durante a fermentação da uva. As cervejarias modernas mantêm as Boas Práticas de Produção (BPP) e os fabricantes de cerveja são mais relutantes em introduzir microrganismos que possam ser responsáveis por uma eventual contaminação do processo produtivo. A aplicação bem sucedida de leveduras não convencionais na fabricação de cerveja inclui o manuseio dessas novas leveduras de uma maneira controlada para alcançar uma cerveja com características desejáveis. Como as espécies de levedura não convencionais geralmente tem um desempenho menor na produção de etanol em comparação com *S. cerevisiae*, essas tem sido raramente utilizadas como culturas iniciadoras (*starters*) na produção de bebidas alcoólicas, sendo, portanto, mais utilizadas em co-fermentação com *S. cerevisiae*. Além disso, o uso dessas leveduras na fabricação da cerveja pode, em alguns casos, exigir mudanças importantes nas condições do processo, como a disponibilidade de oxigênio. Como padrão de fermentação, o mosto é aerado antes do processo para incentivar o crescimento inicial da população de leveduras. Após esse processo, a fermentação prossegue sem oxigênio adicional. Já quando há emprego de leveduras não-convencionais (*Torulaspota delbrueckii* e *Brettanomyces* spp.), baixos níveis de oxigênio são necessários para prosseguir a fermentação (46). No caso do co-cultivo de *Saccharomyces* e leveduras não-convencionais, esta dependência de oxigênio pode desempenhar um papel positivo no controle do crescimento das não *Saccharomyces*, garantindo assim a conclusão bem sucedida da fermentação da *Saccharomyces* (44).

A produção de cerveja depende de uma boa eficiência de rendimento da fermentação que influenciam o aroma e sabor da bebida (47). Os perfis de sabor da cerveja podem ser principalmente atribuídos às atividades bioquímicas durante a fermentação, na qual os açúcares do mosto são convertidos em etanol e compostos voláteis, tais como álcoois superiores e ésteres, que são compostos intermediários e subprodutos do metabolismo da levedura. Estes compostos voláteis são diferentes dos compostos aromáticos presentes no malte e lúpulo e tem um impacto importante no aroma e sabor da cerveja (44).

### 3 PROPOSIÇÃO

Desenvolver uma cerveja de baixo teor alcoólico com até 0,5 % (v/v) por fermentação interrompida que apresente características de bebida isotônica e avaliar a produção de cervejas de baixo teor alcoólico (< 3 % v/v) utilizando-se fermentações mistas. Por objetivos específicos, i. caracterizar e comparar a cerveja do tipo baixo teor alcoólico isotônica com outras bebidas comercialmente disponíveis (bebida isotônica, cervejas sem álcool e cerveja de baixo teor alcoólico isotônica), ii. avaliar o perfil de cepas *Saccharomyces* e não *Saccharomyces* e de co-fermentações com as mesmas para a produção de cervejas de baixo teor alcoólico.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO

Preliminarmente à produção da cerveja de baixo teor alcoólico, lotes-piloto foram produzidos para estabelecer parâmetros para futuras produções. Foram utilizados 3 kg de malte de cevada (Agrária<sup>®</sup>, Guarapuava, Brasil), 7 g de lúpulo Hallertauer Tradition (T90 em Pellet, 4,6 %  $\alpha$ -ácido, Alemanha), 6 g de lúpulo Hallertauer Magnum (T90 em Pellet, 12,3 %  $\alpha$ -ácido, Alemanha) e 11,5 g de levedura para cervejas de baixa fermentação (*Saccharomyces cerevisiae* - M084 *Mangrove Jacks*<sup>®</sup>, Reino Unido). A partir de uma produção-mãe, os grupos foram subdivididos em:

A – fermentação por 2 dias com adição de sais de Na e K ao mosto antes da fermentação;

B – fermentação por 2 dias sem adição de sais;

C – fermentação por 3 dias com adição de sais;

D – fermentação por 3 dias sem adição de sais;

A2 – grupo A submetido à filtração na maturação;

B2 – grupo B submetido à filtração na maturação;

C2 – grupo C submetido à filtração na maturação;

D2 – grupo D submetido à filtração na maturação.

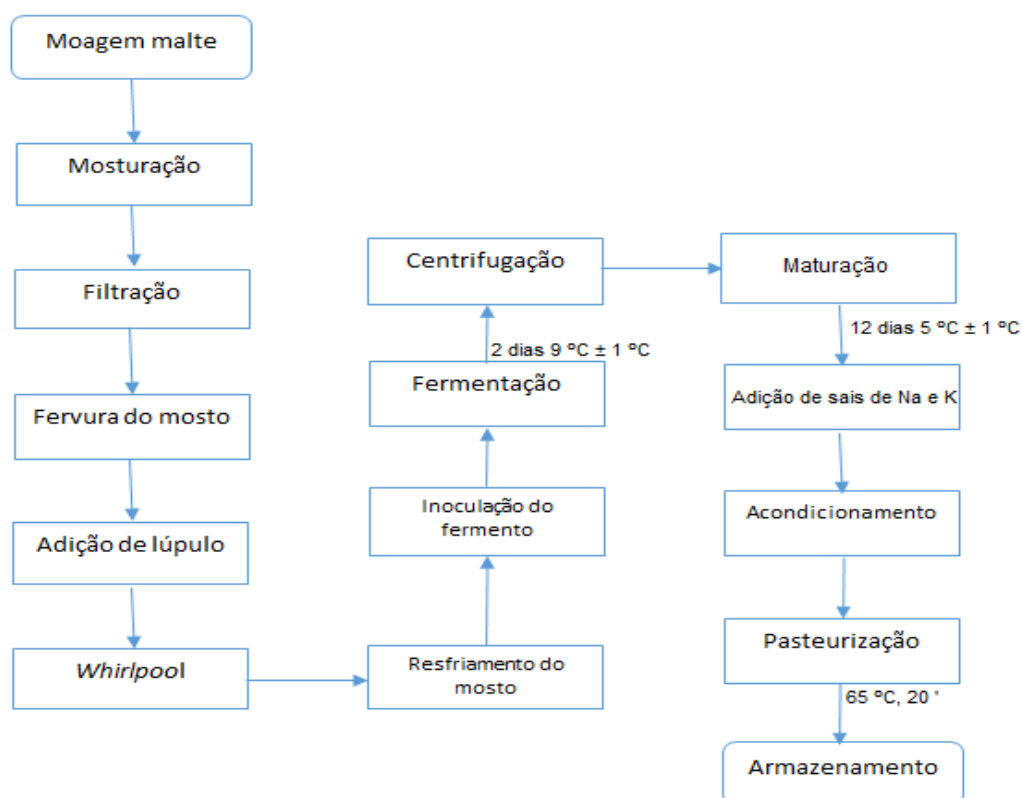
Em função dos resultados obtidos (Anexo 1), conduziu-se a produção na Faculdade de Tecnologia de Jaboticabal (FATEC “Nilo de Stéfani”), Jaboticabal – SP. Para isso, foram utilizados malte de cevada (Best Malz<sup>®</sup>, Alemanha), lúpulo (*Hallertauer Tradition* - T90 em *pellet*, 4,6%  $\alpha$ -ácido, Alemanha), lúpulo (*Hallertauer Magnum* - T90 em *pellet*, 12,3%  $\alpha$ -ácido, Alemanha), levedura (*Saccharomyces cerevisiae* - M084 *Mangrove Jacks*<sup>®</sup>, Reino Unido) e água potável filtrada em filtro de carvão ativado (Tabela 1).

**TABELA 1.** Insumos cervejeiros para produção de 20 L de cerveja de baixo teor alcoólico.

Insumos	Quantidade
Água	20 L
Malte	3000 g
Lúpulo de aroma (Tradition)	8 g
Lúpulo de amargor (Magnum)	6 g
Levedura <i>S. cerevisiae</i> M-084 <sup>®</sup>	10,0 g

As principais etapas do processo de produção incluíram a mosturação, filtração, fervura do mosto, fermentação, remoção da levedura e maturação, conforme descrito no fluxograma da Figura 1.

**Figura 1.** Fluxograma do processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico isotônica por fermentação interrompida. Fonte: Autoria própria.



Foram produzidos quatro lotes de cerveja do tipo baixo teor alcoólico puro malte, para que fosse possível estabelecer a cinética e controle do

processo fermentativo. O malte foi moído em sêmola, casca e farinha e foi empregada água com pH 8,0 na produção da cerveja. Foram utilizadas temperaturas suficientes para a ativação de  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase; 50°C por 5 minutos, 72°C por cerca de 10 minutos (até que o resultado do teste de iodo fosse negativo) e 78°C por 5 minutos, para a inativação das enzimas. Depois de 10 minutos, para a decantação dos sólidos suspensos, iniciou-se a filtração do mosto para outro recipiente e lavagem dos sólidos pela passagem de água quente (70°C) entre os mesmos visando a extração de açúcares. Após este processo, a fervura foi realizada durante uma hora com adição de lúpulo de amargor (Magnum) e de aroma (Tradition) em etapas, antes da finalização da fervura (*late hopping*). Após a adição de lúpulo, foi adicionada ao mosto uma pastilha de floculante e realizado o processo de *whirlpool*, que consiste em gerar uma força centrípeta, fazendo com que as moléculas mais pesadas ( *trub*) se depositassem no fundo do recipiente. Procedeu-se o resfriamento com auxílio de serpentina (20 - 25°C) e acondicionamento do mosto em recipientes previamente sanitizados com solução de ácido peracético (1 g.L<sup>-1</sup>). O fermento foi hidratado com cerca de 100 mL de mosto e suave agitação a temperatura de 25°C. A viabilidade do fermento foi avaliada pelo método de azul de metileno básico antes de iniciar a fermentação e após dois dias ao final da fermentação. Os quatro fermentadores, com cerca de 16 L no total, foram armazenados a 9 ± 1°C durante a fermentação. Após dois dias, a levedura foi removida por centrifugação (2000 g por 5 minutos) e a cerveja foi armazenada em recipientes maturadores a 5 ± 1°C por mais 12 dias.

A densidade inicial do mosto (*original gravity*) foi de 1,026 ± 0,001, o teor de sólidos solúveis (SST) foi de 6,8 ± 1,0 %, pH de 6,26 ± 0,34 e a densidade final da cerveja (*final gravity*) de 1,025 ± 0,001. Durante a maturação, foram adicionados à bebida 0,5 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio (NaCl) e 0,125 g.L<sup>-1</sup> de fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) para os ajustes de sais conforme a RDC nº 18 da ANVISA, de 27 de abril de 2010 (10). A pasteurização foi realizada no último dia, por imersão, empregando-se de 80 a 120 unidades de pasteurização (UP), o que correspondeu a 65°C por 20 minutos.

O processo adotado teve por objetivo manter o teor de etanol baixo por meio da remoção da levedura, menor tempo de fermentação e utilização de menos malte de cevada quando comparado aos procedimentos adotados para

a produção de cerveja do tipo 'Pilsen'. Assim, normalmente obtêm-se bebidas que são organolepticamente mais aceitáveis que aquelas obtidas pelos métodos de desalcoolização, pois os metabólitos produzidos pelas leveduras colaboram para compor o sabor e aroma da cerveja. (48).

Os lotes-piloto foram produzidos entre fevereiro de 2017 e julho de 2017 e a produção de quatro lotes padronizados (Figura 2) entre julho de 2017 e fevereiro de 2018, assim como as análises de controle de qualidade dos mesmos.

**Figura 2.** Etapas do processo de produção da cerveja de baixo teor alcoólico com características isotônicas. A. Mosturação, B. Filtração dos sólidos, C. Fervura do mosto, D. Preparo da levedura para inoculação, E. Centrifugação para remoção de levedura, F. Fermentação/maturação em estufa incubadora. Fonte: Autoria própria.



#### 4.2 TESTE COMPARATIVO COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE BEBIDAS

Visando comparar a cerveja de baixo teor alcoólico com propriedades isotônicas produzida pelo processo de fermentação interrompida com amostras de bebidas comercialmente disponíveis aos consumidores, foram adquiridas quatro amostras de lotes assim descritos:

- *Cerveja tipo Pilsen*: cerveja regular do tipo 'Pilsen', puro malte. Lotes adquiridos em outubro de 2017 comercializados no estado de São Paulo com datas de validade entre março de 2018 e junho de 2018.

- *Bebida Isotônica*: repositor hidroeletrólítico. Lotes no sabor limão, laranja e maracujá foram adquiridos em outubro de 2017 comercializados no estado de São Paulo com datas de validade entre abril de 2018 e junho de 2018.

- *Cerveja 0,0%*: cerveja com teor alcoólico de 0% (v/v) com emprego de adjuntos de malte na formulação. Lotes de quatro marcas distintas que apresentam maior prevalência nos supermercados de cidades do estado de São Paulo foram adquiridos entre novembro de 2017 a janeiro de 2018 com datas de validade entre fevereiro de 2018 a julho de 2018.

- *Cerveja Isotônica de baixo teor alcoólico*: cerveja do tipo baixo teor alcoólico, (< 0,5% v/v) e características de bebida isotônica. Lotes adquiridos em dezembro de 2017 na região de Stuttgart (Alemanha) com datas de validade entre abril de 2018 a junho de 2018.

#### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi instalado segundo um delineamento inteiramente casualizado (DIC) constituído dos quatro tratamentos representados pelas bebidas desenvolvidas (i. cerveja de baixo teor alcoólico por fermentação interrompida com características isotônicas) e amostras controle, (ii. cerveja regular 'Pilsen' puro malte adquirida no mercado nacional; iii. bebida isotônica adquirida no mercado nacional; iv. cervejas 0,0% álcool adquiridas no mercado nacional; v. cerveja de baixo teor alcoólico do tipo isotônica importada), com quatro repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey.

#### 4.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

Para a análise e caracterização da cerveja de baixo teor alcoólico com propriedades isotônicas produzida pelo processo de fermentação interrompida, foram coletadas amostras ao longo da fermentação e maturação. Estas foram filtradas e posteriormente congeladas a -50 °C até o momento das análises. Já as amostras de fermentações mistas foram congeladas a -20 °C.

#### **4.4.1 pH**

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico. Este consistiu em se determinar o pH das amostras pela imersão do eletrodo diretamente na bebida utilizando um pHmetro de bancada (Gehaka, PG 2000, Brasil) previamente calibrado (49).

#### **4.4.2 Determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST)**

O teor de SST foi determinado pelo índice de refração com uso de refratômetro (Impac, IPB-32KT, Brasil) que foi calibrado para análises realizadas a 20°C. O resultado foi expresso em porcentagem (%), sendo equivalentes a 1 g de sólidos solúveis em 100 mL de solução.

#### **4.4.3 Teor alcoólico**

O teor alcoólico foi determinado por meio de um densímetro (Anton Paar®, DMA 4500 M, Brasil) que possui tubo oscilatório em “U” e foi calibrado com álcool absoluto (99%). Além da densidade, este equipamento forneceu o teor alcoólico da cerveja que, para isso, foi previamente destilada em microdestilador (Tecnal, TE-012, Brasil), e posteriormente, seu destilado submetido à análise densimétrica (49).

#### **4.4.4 Osmolalidade**

A osmolalidade foi determinada pelo ponto de depressão de congelamento da água utilizando um osmômetro (Advanced Instruments Inc., 3250, EUA) previamente calibrado com soluções-padrão de 100, 200 e 1000 mOsmol.kg<sup>-1</sup>. Também foram aferidas as osmolalidades da água deionizada e soro fisiológico, obtendo-se zero (0) e 290 mOsmol.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Os resultados foram expressos em mOsmol.kg<sup>-1</sup> (50).

#### 4.4.5 Cor

A análise de cor foi realizada em espectrofotômetro UV-visível com leitura a 430 nm, segundo metodologia adaptada da *European Brewery Convention* (51). As amostras foram filtradas e centrifugadas a 2000 g por 10 minutos para eliminar as partículas em suspensão ou turbidez. Esta análise foi realizada em triplicata e o branco foi constituído de água destilada. A cor foi determinada utilizando-se a equação (1) e expressa em unidades SRM (*Standard Research Method*):

$$\text{Cor (SRM)} = 10.A.Fc \quad (1)$$

Onde: A: absorbância obtida a 430 nm, Fc: fator de correção para a cubeta de 1 cm = 1,27

Para o cálculo na unidade de EBC, utilizou-se a equação (2):

$$EBC = SRM .1,97 \quad (2)$$

Onde: EBC: unidade *European Brewery Convention*

Segundo o Decreto nº 6.871, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), de 4 de junho de 2009, as cervejas claras devem apresentar menos de vinte unidades EBC (*European Brewery Convention*) (51,52).

#### 4.4.6 Amargor

Os alfa-ácidos são os principais componentes da lupulina e portanto, responsáveis pelo sabor amargo na cerveja. A concentração de iso-alfa-ácidos dissolvidos na cerveja é medida em *International Bitterness Units* (IBU) (53). Os iso-alfa-ácidos foram extraídos a partir de 10 mL de amostras resfriadas a 5°C com a adição de 20 µL de álcool octílico, 1 mL de HCl (3 M) e 20 mL iso-octano. Em seguida, os tubos foram agitados por 15 minutos e centrifugados a 2000 g por 10 minutos para romper a emulsão. A concentração foi determinada em espectrofotômetro UV-visível (Nova Instruments, NI2200, Brasil) no comprimento de onda de 275 nm. Para o branco utilizou-se iso-octano adicionado de 20 µL de álcool octílico (54,55).

Para calcular o amargor em IBU, utilizou-se a equação (3):

$$IBU = A . 50 \quad (3)$$

Onde: A: absorvância a 275 nm.

#### **4.4.7 Determinação de acidez total titulável (ATT)**

A determinação do teor de ácidos presentes nas amostras foi realizada por meio de titulação ácido-base (49). Foram utilizados 10 mL de amostra para cada repetição analítica. As amostras foram tituladas com solução de NaOH a 0,05 M, até pH 8,2 - 8,4 que corresponde ao ponto final de viragem do indicador fenolftaleína (0,1%). A ATT foi expressa em mEq.L<sup>-1</sup>

#### **4.4.8 Determinação do teor de açúcares redutores e totais**

O teor de açúcares redutores e totais foi determinado pelo método titulométrico de Lane-Eynon (49,56). Os açúcares não redutores sofreram hidrólise prévia em meio ácido, liberando os dissacarídeos em seus monossacarídeos, os quais reagiram com os íons cúpricos da solução de Fehling, reduzindo-os a íons cuprosos, sob a ação do calor em meio alcalino. O resultado foi expresso em teores de açúcares redutores e de açúcares totais em glicose (g.L<sup>-1</sup>).

#### **4.4.9 Compostos fenólicos - Índice de polifenóis totais**

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada baseada no método (57) com adaptações (58). Foram preparados padrões de ácido gálico em água destilada nas concentrações de 1,8; 3,6; 5,4; 7,2 e 9,0 g.L<sup>-1</sup>. A reação colorimétrica com reagente de Folin-Ciocalteau e carbonato de sódio a 15 % foi realizada em triplicata. Após 1h30, a absorvância das amostras foi lida em espectrofotômetro (Nova Instruments, NI2200, Brasil) em comprimento de onda de 760 nm, utilizando-se água destilada e reagente de Folin-Ciocalteau como branco. O teor de fenólicos totais foi expresso em mg.L<sup>-1</sup> de ácido gálico.

#### **4.4.10 Determinação do teor de sódio (Na<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>)**

As análises foram realizadas utilizando-se espectrometria de emissão atômica de chama, em fotômetro de chama (*Instrumentation Laboratory Inc.*, modelo 143, EUA) nas quais as amostras desgaseificadas foram diluídas em 1/5 (v/v) em água destilada (59). Para a curva analítica, foram preparadas 3 soluções de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> e Li<sup>+</sup> [utilizado como padrão interno (20 mg.L<sup>-1</sup>)]. As concentrações finais de Na<sup>+</sup> foram: 1,0; 10; 20; 30 e 40 mg.L<sup>-1</sup>. Já as de K<sup>+</sup> foram: 1,0; 5,0; 10; 15; 20 mg.L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg.L<sup>-1</sup>.

### **4.5 DETERMINAÇÕES MICROBIOLÓGICAS**

Foram realizadas análises microbiológicas em produções desenvolvidas com a finalidade de avaliar as condições de sanitização e adaptação das leveduras ao mosto cervejeiro.

#### **4.5.1 Contagem global de microrganismos**

Após 10 dias de maturação, as amostras de cerveja foram submetidas a contagem global de microrganismos aeróbios estritos (bactérias heterotróficas) pela técnica de espalhamento superficial em *Plate Count Agar* (PCA). As amostras foram previamente homogeneizadas, diluídas e incubadas por 48 h a 32°C e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia por mL (UFC.mL<sup>-1</sup>).

Foram adicionados 0,9 mL de solução salina 0,9 % (p/v) estéril e 100 µL de amostra. Em seguida, foram homogeneizadas e diluídas de acordo com as recomendações descritas pelo *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (60). As diluições das amostras foram selecionadas, baseando-se na contagem de microrganismos esperada para cada amostra. Foram realizadas duplicatas para cada diluição e selecionadas placas com contagens entre 30 - 300 colônias.

#### **4.5.2 Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de azul de metileno básico (Ringer)**

Neste método adaptado (61), as células não viáveis se coram em contato com o azul de metileno, enquanto as viáveis não. A contagem é realizada em câmara de Neubauer utilizando-se 0,5 mL de suspensão celular obtida do mosto antes e após a fermentação. Para o cálculo da viabilidade celular, utilizou-se a seguinte equação:

$$Viabilidade (\%) = \frac{\text{viáveis}}{\text{viáveis} + \text{não viáveis}} \cdot 100 \quad (4)$$

Onde: Viáveis: células vivas não coradas, Não viáveis: células mortas coradas de azul.

#### **4.6 ANÁLISE SENSORIAL**

A análise sensorial foi realizada no Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Alimentos e Nutrição da UNESP, *Campus* de Araraquara e para a realização da mesma o protocolo de avaliação foi previamente encaminhado à Comissão de Ética da UNESP-FCF, sendo a mesma aprovada com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) 60050016.8.0000.5426 e número de parecer 2.068.055 (ANEXO II).

O teste de aceitação avaliou a aparência, aroma, sabor e impressão global da cerveja desenvolvida e de mais duas amostras comerciais de cervejas do tipo 0,0%. A escala hedônica variou de 1 “desgostei muitíssimo” a 9 “gostei muitíssimo”, sendo 5 para “indiferente”. A atitude de compra também foi avaliada através de uma escala de 5 pontos que varia de: “Certamente eu compraria este produto” a “Certamente eu não compraria este produto” (62), de acordo com o modelo de ficha (ANEXO II). Para isso, contou com a avaliação de um grupo de 115 julgadores não treinados com mais de 18 anos e que não possuíam sensibilidade ou alergia a nenhum dos ingredientes da bebida. Pessoas intolerantes ao glúten ou portadora de doenças crônicas não participaram da análise sensorial. Algumas perguntas como: “você gosta ou costuma tomar isotônicos” ou “você gosta ou costuma tomar cerveja” estiveram presentes no questionário para avaliar a representatividade das pessoas que

apreciam esses produtos, bem como perguntas sobre a frequência de atividade física destes mesmos julgadores.

As cervejas comerciais corresponderam às cervejas avaliadas anteriormente cujas abreviações eram 0,0% (1) e 0,0% (2). Estas foram adotadas para esta análise sensorial devido a maior prevalência destas marcas nos supermercados do estado de São Paulo.

Os resultados foram avaliados mediante análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

#### 4.7 CARACTERIZAÇÃO DE LEVEDURAS PARA APLICAÇÃO TECNOLÓGICA EM CERVEJAS

Vinte cepas, das quais catorze *Saccharomyces* e seis não *Saccharomyces*, isoladas previamente de matrizes alimentares (pão, mosto de uva e cerveja), foram avaliadas quanto ao seu desempenho fermentativo para glicose e maltose, estresse oxidativo, catalase e pela extração de DNA das cepas *Saccharomyces* seguida do sequenciamento em PCR da região inter- $\delta$ . Todas as cepas pertenciam à coleção de culturas do “Laboratório de Microbiologia de Leveduras” da Università degli Studi della Basilicata (Potenza, Itália).

Entre as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* empregadas nos testes constavam: CA1-4Sc2; CD2-6Sc2, Ba215, E1-6, EC1118, LL-1, M3-59, M4, M5-15, P4, Sc5-25, TA4-10, 4LBI-3. Já a cepa Sb, *Saccharomyces boulardii*, apesar de pertencer ao mesmo gênero, não é da mesma espécie. Outras 6 cepas, não *Saccharomyces* incluíram: duas espécies de *Candida zemplinina* (SNM2 e TSF), uma espécie de *Zygosaccharomyces bailii* (CR1) e três espécies de *Torulaspota delbrueckii* (LC2-1, 365 e 425).

#### **4.7.1 Avaliação da capacidade fermentativa das leveduras**

As cepas foram cultivadas em meio YPD (*yeast extract peptone dextrose*) contendo 1% (p/v) de extrato de levedura, 2% de peptona (p/v) e 2% (p/v) de glicose. Também foram preparadas soluções estéreis de açúcares (glicose e maltose) como fonte de carbono a uma concentração de 60 g.L<sup>-1</sup>. Antes da inoculação no meio, foi efetuada a suspensão em água estéril de cada cepa, cerca de 10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>, cuja absorbância estava compreendida entre 0,2 a 0,4 quando avaliada em comprimento de onda de 600 nm. Em seguida, 0,1 mL dessa suspensão foi inoculada em tubos de ensaio contendo o meio, solução de glicose ou maltose e tubo de Durham, sendo estes armazenados em estufa a 26 ± 1°C por 14 dias. O experimento foi conduzido em triplicata e o controle da produção de gás foi efetuado todos os dias e expresso como: forte, fraco, fraquíssimo ou ausente segundo as bolhas de gás presentes no interior do tubo de Durham. Também foi realizado tubo controle negativo sem levedura e positivo com *S. cerevisiae* (EC), segundo a metodologia adaptada descrita (63)

Os dados adimensionais foram submetidos à análise de agrupamento (*cluster*), juntamente com os dados dos itens 4.5.2 e 4.5.3. O dendrograma foi gerado usando o método de Ward (44).

#### **4.7.2 Atividade da catalase**

A atividade catalítica das leveduras foi avaliada segundo método adaptado (63). Para isso, uma gota de solução de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) foi colocada diretamente em contato com a levedura refrescada 48 h antes do experimento. Os resultados foram expressos em tempo para a formação de bolha em segundos (s).

#### **4.7.3 Tolerância ao estresse oxidativo**

As cepas foram submetidas a crescimento anaeróbico em 20 mL de meio YPD em inoculação por profundidade em placas. Antes da inoculação no meio, foi efetuada suspensão em água estéril de cada cepa, cerca de 10<sup>6</sup>

celulas.mL<sup>-1</sup>, cuja a absorvância estava compreendida entre 0,2 a 0,4 quando avaliada em comprimento de onda de 600 nm. A sensibilidade ao peróxido de hidrogênio foi avaliada pela adição de 70 µL de quatro concentrações distintas de peróxido (25, 50, 100 e 250 mM) em cada poço de 5 mm de diâmetro no meio de cultura. As placas foram incubadas a 26 ± 1°C por 24 - 48 h. Os resultados foram avaliados segundo o tamanho do halo formado (zona de inibição), ou seja, onde não houve crescimento da levedura de acordo com versão adaptada do método (63).

#### **4.7.4 Extração de DNA**

Foram obtidas colônias únicas provenientes de cultivo em superfície em meio YPD. A colônia foi ressuspensa em 1 mL de solução tampão estéril (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,1 M NaCl, pH 7,8 ± 0,2) e posteriormente homogeneizadas em vortex. Em seguida, centrifugou-se por 5 minutos (2000 g) e eliminou-se o sobrenadante. O *pellet* foi lavado com água estéril, novamente homogeneizado e centrifugado. O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 0,2 mL de InstaGene<sup>®</sup> matrix ao *pellet*. Procedeu-se à incubação a 56°C por 30 minutos, homogeneizou-se e o material foi submetido à fervura por 8 minutos. Posteriormente, homogeneizou-se e centrifugou-se. O sobrenadante foi transferido para um eppendorf e congelado até o momento da realização da análise de PCR (64).

#### **4.7.5 Amplificação de DNA e primers**

Foram utilizados os *primers* delta2 R (5'-GTGGATTTTTATTCCAAC-3') (65) e delta12 F (5'-TCAACAATGGAAATCCCAAC-3') (66). O programa de amplificação da região interdelta foi: 1º fase: desnaturação em um ciclo de 97°C por 10 minutos. 2º fase: amplificação em 35 ciclos de 95°C por 30 minutos. 3º fase: extensão final, em um ciclo de 72°C por 10 minutos. O produto da amplificação foi separado mediante eletroforese em gel de agarose a 2% submetido a 90 V por 90 minutos, em 1% de tampão Tris/borato/EDTA.

As reações foram executadas em termociclador (Bio-Rad<sup>®</sup>, Itália) com os *primers* citados anteriormente. A reação foi preparada a partir de 3 µL de DNA,

0,25  $\mu\text{L}$  *Taq* polimerase (Pharmacia<sup>®</sup>), *Taq buffer* (10  $\mu\text{L}$  Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,08%, Nonidet P-40<sup>®</sup>), 25 mM de cada *primer*, 10 mM de cada dNTP e 4  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$ .

#### **4.7.6 Fermentação em escala de laboratório com culturas mistas**

Baseado na capacidade fermentativa das cepas anteriormente descritas, foram escolhidas 4 cepas para que fossem executadas as fermentações mistas de uma cepa *Saccharomyces* com outra cepa não *Saccharomyces* em pequena escala, ou seja, 100 mL de mosto. Adotou-se a cepa P4 *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) e as seguintes cepas não *Saccharomyces*: *Torulaspora delbrueckii* (Td) (LC2-1), *Candida zemplinina* (Cz) (TSF), *Zygosaccharomyces bailii* (Zb)(CR1). Assim, foram executadas as seguintes fermentações mistas em triplicata em meio constituído de extrato de malte (17,0  $\text{g.L}^{-1}$ ) e peptona microbiológica (3,0  $\text{g.L}^{-1}$ ) com os seguintes grupos: 1) Sc P4 sem adição de outra cepa; 2) Sc P4 + Td LC2-1; 3) Sc P4 + Cz TSF; 4) Sc P4 + Zb CR1.

As fermentações foram realizadas a 20°C em frascos contendo 100 mL do meio, utilizando-se mosto maltado lupulado de densidade 1,0085; pH 5,92 e SST de 9%. As cepas foram inoculadas na concentração de aproximadamente  $10^6$  células. $\text{mL}^{-1}$ . As fermentações foram monitoradas medindo-se a perda de massa dos frascos devido à produção de  $\text{CO}_2$ , que foi seguido até o final da fermentação. Outras determinações analíticas incluíram as análises de SST (%), teor de etanol (% v/v) e de compostos secundários ( $\text{mg.L}^{-1}$ ), antes e após a refermentação.

Os compostos secundários como acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol, 2-butanol, 1-butanol, acetoína, ácido acético, 2-metil-butanol, 3-metil-butanol foram determinados por injeção direta da amostra utilizando-se cromatografia gasosa, ou seja, 1  $\mu\text{L}$  de amostra de cerveja antes e após a refermentação, foram injetadas em cromatógrafo (Agilent 7890 A, Holanda) com coluna de vidro de 180 cm  $\times$  2 mm com Carbopack B/5% e Carbowax 20% (Supelco<sup>®</sup>). A amostra de entrada foi operada a 200°C e a temperatura do forno foi programado para aumentar de 70°C para 120°C a uma taxa de 5°C / min a 120°C, 2°C / min a 130°C e 7°C / min a 180°C. A duração da corrida foi de 27

minutos. Para a análise de teor de etanol, foi utilizado o mesmo equipamento, porém sem rampas de temperatura (100°C) e duração da corrida de 8 minutos. O gás da fase móvel foi o hélio (He) a um fluxo de 20 mL.min<sup>-1</sup>. Os padrões dos referidos compostos foram injetados previamente, obtendo-se a curva de calibração e o tempo de retenção para cada pico. Os dados foram analisados por análise de componentes principais (ACP) com o software Past 3<sup>®</sup> (44).

#### ***4.7.7 Avaliação da viabilidade celular em meio ágar nutriente WL***

A viabilidade e morfologia das colônias foram avaliadas no tempo zero da fermentação e final da maturação pela contagem de células viáveis em meio ágar nutriente WL. Para isso, o meio foi preparado conforme instrução do fabricante (Oxoid, Hampshire, UK), 75 g dissolvidos em 1 L de água. O pH foi corrigido com solução de carbonato de sódio para  $6,5 \pm 0,2$  e o meio esterilizado em autoclave por 15 minutos a 121°C. A incubação para o cultivo ocorreu em placas a  $28 \pm 1^\circ\text{C}$  de 3 a 5 dias. (44).

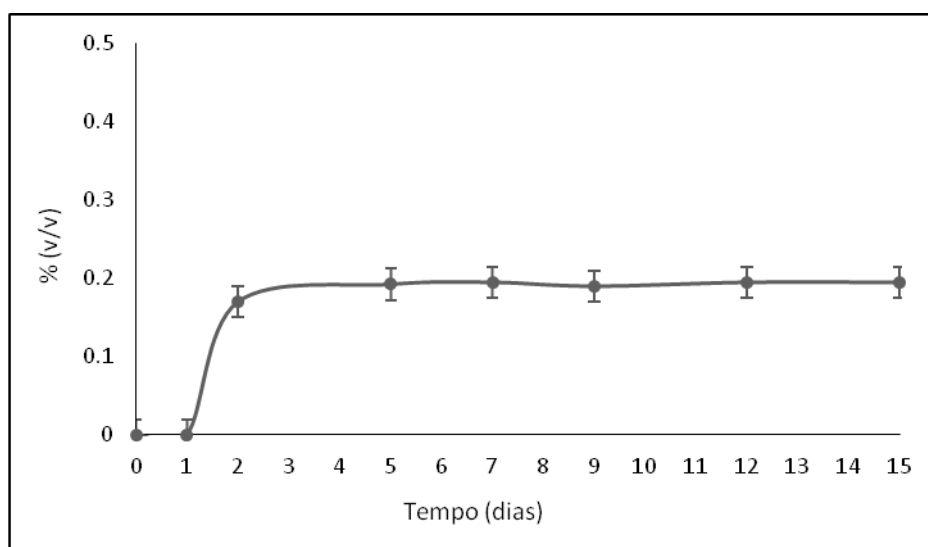
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJAS DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO

A partir dos resultados obtidos com cervejas de baixo teor alcoólico, foram produzidos lotes de cervejas de baixo teor alcoólico conforme o descrito no item 4.1 e ANEXO I. A fermentação foi de dois dias, com adição de sais no dia zero e o fermento foi removido por meio de centrifugação, que comparada à filtração, mostrou-se mais eficiente, mais rápida e com menor exposição do produto à contaminação e oxidação pelo oxigênio presente no ar.

A produção de etanol (%) durante a fermentação e maturação da cerveja de baixo teor alcoólico pode ser observada na Figura 3.

**Figura 3.** Teor de etanol (% v/v) observado durante o processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico isotônica por 15 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=4).

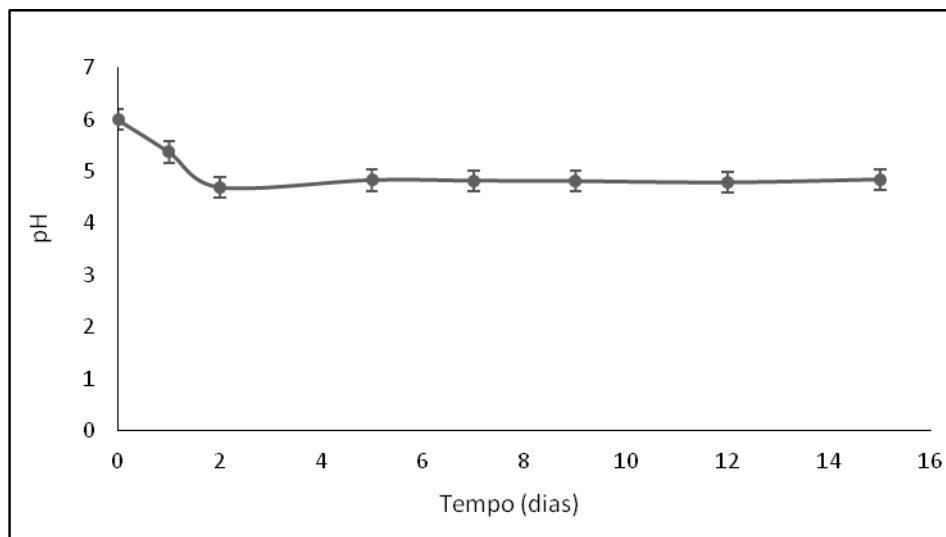


Foi observado aumento no teor alcoólico (%) até o segundo dia de fermentação, a partir do qual verificou-se uma estabilização em 0,2 % (Figura 3). Desta forma, a cerveja produzida pode ser classificada como cerveja de baixo teor alcoólico, segundo o Decreto nº 6.871, do MAPA, de 04 de junho de 2009 e determinação mais recente do STJ (52, 5).

Em relação ao pH, inicialmente foi observado um valor de 6,0 e durante o processo de fermentação, destacadamente nos dois primeiros dias, foi

observada uma redução, seguida de uma estabilização na faixa de  $4,8 \pm 0,1$  até o final da maturação (Figura 4).

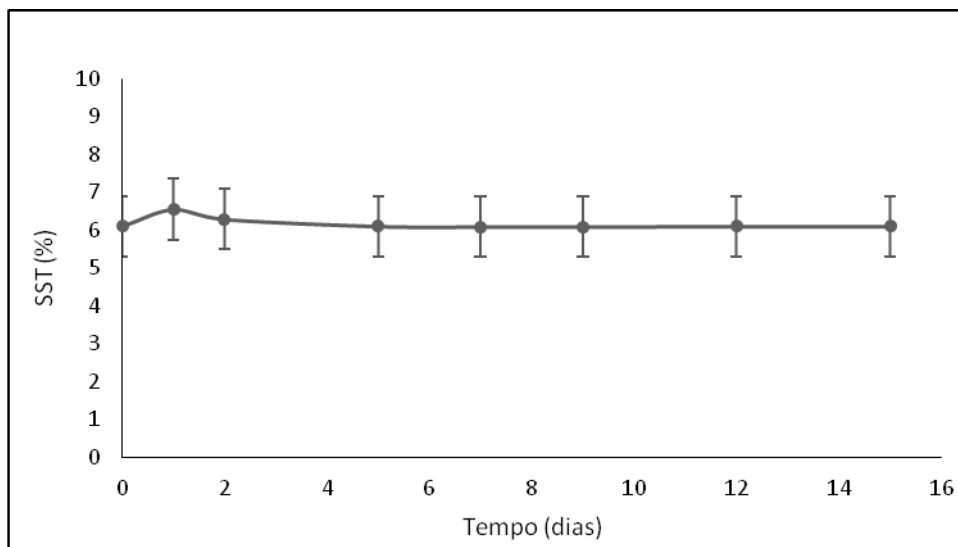
**Figura 4.** Potencial hidrogeniônico (pH) observado durante o processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico isotônica por 15 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=4).



O pH adequado para o desenvolvimento ideal das leveduras é muito variável, pois cada cepa tem suas condições ótimas de desenvolvimento. Em uma revisão sobre o pH no malte e produção de cerveja (67), alguns autores citaram o pH 6,0 como sendo o mais próximo ao pH fisiológico das células e, portanto, mais efetivo ao desenvolvimento das leveduras. Por outro lado, outros autores citam a faixa de pH entre 5,3 e 5,6 como a mais adequada por favorecer o aproveitamento de aminoácidos.

Existem vários fatores que influenciam o cultivo da *S. cerevisiae*, pois o crescimento celular não depende apenas do pH. Fatores como a temperatura e componentes do meio, por exemplo, carbono e nitrogênio, são muito importantes para o desenvolvimento dos microrganismos. No caso da *S. cerevisiae*, há uma preferência por açúcares em relação a qualquer outra fonte de carbono disponível (68). Desta forma, o SST também foi determinado (Figura 5).

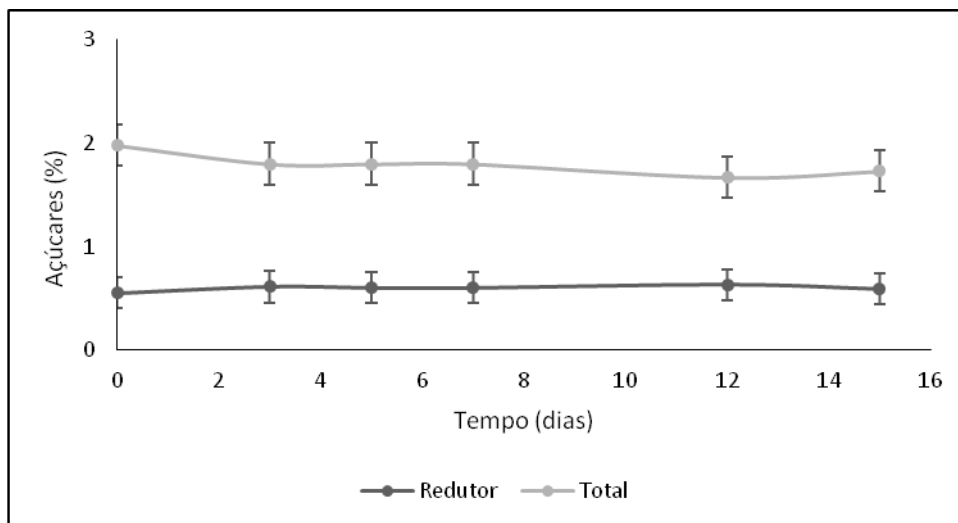
**Figura 5.** Teor de sólidos solúveis (SST %) observado durante o processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólica isotônica por 15 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=4).



Os valores de SST não apresentaram variação significativa ( $p > 0,05$ ) durante a fermentação e maturação, mantendo-se em torno de 6,0 % (Figura 5). Desta forma, grande parte do açúcar disponível não foi aproveitada para a produção de etanol pelo processo fermentativo, o que também foi confirmado pela manutenção dos teores de açúcares redutores e totais (Figura 6).

Em geral, a composição dos mostos varia muito quanto ao teor de açúcares, uma vez que esta composição depende da matéria-prima empregada, principalmente do malte e dos fermentos utilizados, o que pode resultar em uma cerveja com até 90 % de carboidratos. O pequeno consumo de monossacarídeos indica que esta fonte não foi esgotada completamente e assim, não foram exploradas pela levedura outras fontes como maltose e maltotriose, que são abundantes no mosto, porém são normalmente utilizadas após o esgotamento dos açúcares mais simples (68).

**Figura 6.** Teor de açúcares totais e redutores (%) observados durante o processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico isotônica por 15 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=4).



A preferência por glicose pelas leveduras em relação a qualquer outro açúcar sofre influência de mecanismos controlados pela indução das proteínas que favorecem a fermentação, repressão das enzimas da cadeia respiratória e do ciclo do glioxilato e inativação das enzimas-chave da gluconeogênese. Quando a célula segue o metabolismo fermentativo, ocorre o processo de transformação do piruvato, na ausência de oxigênio, com objetivo de oxidar a nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) produzida na via glicolítica. Etanol, ácidos orgânicos e CO<sub>2</sub> são produzidos, além da excreção do glicerol. Este último obtido pela reoxidação de NADH. A ausência de tiamina no mosto, por exemplo, pode favorecer a produção de ácido láctico e assim o NADH é oxidado, por redução do piruvato, para lactato em vez de acetaldeído em etanol (69).

A manutenção dos SST (Figura 5) e de açúcares totais e redutores (Figura 6), comprovam a limitação da produção de etanol durante o processo fermentativo (Figura 3).

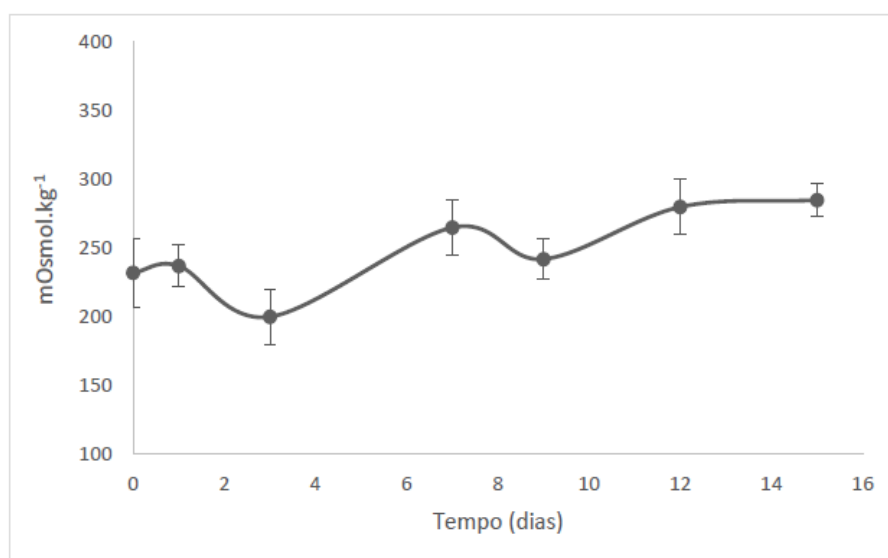
É importante ressaltar que na fase *lag* ocorre a adaptação das células ao meio de crescimento e este corresponde ao período que vai da terceira a décima quinta hora após a inoculação. Normalmente não se observam alterações significativas nos parâmetros físico-químicos durante esta etapa. Contudo, há síntese de enzimas e coenzimas que irão constituir o processo de divisão celular na etapa exponencial de crescimento, que ocorre do primeiro ao

quarto dia após a inoculação. Durante esta fase, ocorre aumento da contagem de células viáveis assim como produção de etanol e compostos de aroma. A glicose e frutose são consumidos primeiramente, em seguida a sacarose, maltose e por último a maltotriose. Contudo, algumas cepas de leveduras não fermentam este último açúcar e a capacidade de fermentar a maltotriose determina a cada cepa seu grau de atenuação (70). No caso da cerveja de baixo teor alcoólico produzida, a interrupção da produção ocorreu no início desta fase, com poucas alterações nos parâmetros físico-químicos e nos teores de açúcares, conduzindo a um teor de etanol inferior a 0,20 % (Figuras 6 e 3).

Na fase estacionária, o número de células viáveis é constante e ocorre de três a dez dias após a inoculação. A maioria dos compostos de aroma já foram produzidos e a cerveja é denominada “verde” (71).

Para conferir à cerveja de baixo teor alcoólico características de bebidas isotônicas, ao final a maturação (12º dia) foram adicionados sais de Na e K na forma de cloreto de sódio (NaCl) e fosfato monobásico de potássio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Desta forma, a osmolalidade da bebida apresentou suave oscilação durante a produção permanecendo na faixa que a caracteriza como bebida isotônica após a adição de Na e K (285 mOsmol/kg<sup>-1</sup>) (Figura 7).

**Figura 7.** Osmolalidade (mOsmol.kg<sup>-1</sup>) observada durante o processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico isotônica por 15 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=4).

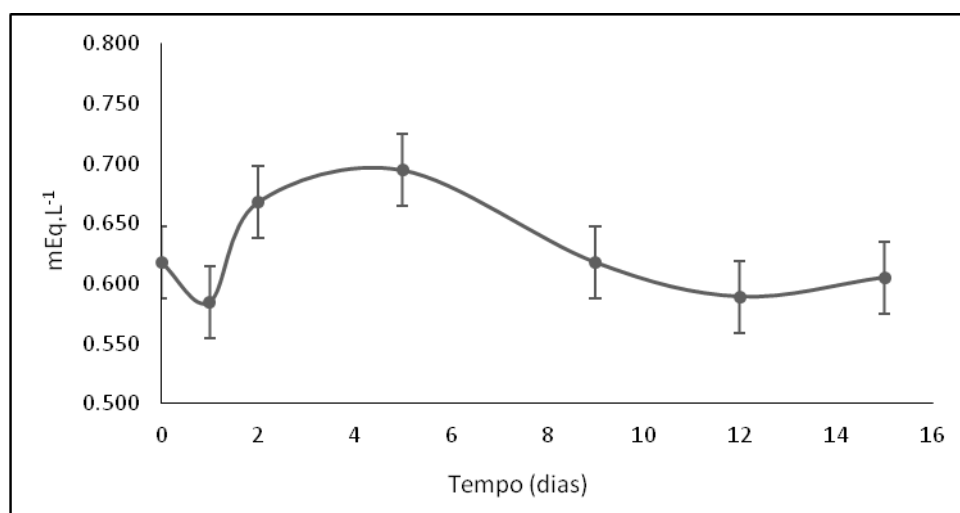


A adição dos sais que constituem a formulação das bebidas isotônicas comerciais, tais como o cloreto de sódio, o citrato de sódio e o fosfato

monobásico de potássio foi avaliada na produção dos lotes-piloto (item 4.1, ANEXO I). As concentrações utilizadas seguiram as recomendadas pela RDC nº 18, do ANVISA, de 27 de abril de 2010, ou seja, 0,500 g.L<sup>-1</sup> de sais de Na e 0,125 g.L<sup>-1</sup> de sais de K (10). A adição de Na e K no momento da inoculação não foi capaz de impedir a fermentação, tampouco produziu efeitos tóxicos nocivos às leveduras. Além disso, tanto a adição no momento da inoculação como na maturação, não alteraram as características sensoriais do produto final.

Em relação a acidez titulável (Figura 8), houve um aumento significativo no início da fermentação, até o segundo dia, que coincidiu com a diminuição de pH (Figura 4).

**Figura 8.** Acidez titulável (mEq.L<sup>-1</sup>) observado durante o processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico isotônica por 15 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=4).

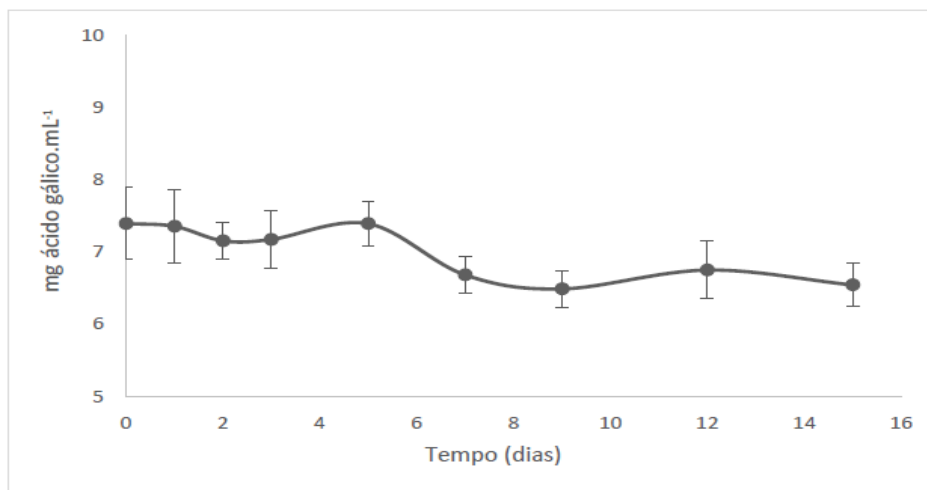


Grande parte dos ácidos encontrados nas bebidas é oriunda dos insumos que as originaram. No entanto, o metabolismo das leveduras também é capaz de alterá-los, principalmente durante a fermentação, pois estas são capazes de produzir outros ácidos orgânicos como sub-produtos das vias metabólicas (72). Em geral, existem mais de 100 tipos de ácidos orgânicos presentes nas cervejas que ajudam a constituir o sabor reconhecido como refrescante e leve. O ideal é que a acidez titulável esteja controlada a níveis próximos ou inferiores a 1,65 mEq.L<sup>-1</sup>, uma vez que quando encontra-se acima de 1,9 mEq. L<sup>-1</sup>, apresenta acidez marcante (73).

Durante a fase *lag* da fermentação, acetato e piruvato são excretados pelas próprias leveduras, o que justificaria o aumento de acidez titulável no segundo dia e consequente manutenção dos níveis até o quinto dia, onde mesmo na ausência da levedura os níveis de piruvato não são alterados na cerveja (69). O succinato também é formado nas etapas iniciais de produção de etanol, principalmente quando o pH chega a faixa de 4,0 a 4,4 (72). Portanto, apesar da cerveja de baixo teor alcoólico produzida não ter chegado a um pH tão baixo, ainda assim pode ter havido contribuição do ácido succínico para o aumento da acidez titulável durante a fermentação e início da maturação.

Quanto aos compostos fenólicos, não houve alterações significativas ( $p > 0,05$ ) em seus níveis no decorrer da produção e a oscilação encontrada pode ser considerada como resultante das variações entre os distintos lotes (Figura 9).

**Figura 9.** Compostos fenólicos ( $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  ácido gálico) observados durante o processo de produção de cerveja de baixo teor alcoólico isotônica por 15 dias. As barras verticais indicam o desvio padrão da média ( $n=4$ ).



Os compostos fenólicos são em sua maioria provenientes do malte (70 a 80 %) e estão presentes como fenóis simples, ácidos fenólicos, derivados de ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides. Estes são modificados durante as etapas de produção da cerveja (74,75). A mosturação é responsável por boa parte do incremento dos compostos fenólicos, sendo que na fermentação pode ocorrer aumento ou diminuição devido à precipitação deste compostos. Na filtração pode ocorrer também um decréscimo de compostos fenólicos devido à

remoção de partículas em suspensão na bebida. Além disso, o armazenamento, principalmente por longos períodos (acima de 10 semanas), também pode comprometer a integridade do ácido clorogênico e vanílico, no entanto, outros compostos parecem não sofrer influência pelo armazenamento (76).

Foram estudados os efeitos dos polifenóis em bebidas e destacaram que na cerveja os compostos presentes no lúpulo, tais como o xantoumol e seus metabólitos isoxantoumol e 8-prenilnaringenina, promovem benefícios à saúde atuando como anticarcinogênicos, anti-inflamatórios e antioxidantes (75). A disponibilidade dos compostos fenólicos em cada bebida variou muito e foi altamente dependente da matéria-prima, processo de produção e solubilidade dos mesmos nos meios que os constituem, por isso, é complexo atribuir benefícios específicos a cada um deles.

A viabilidade celular da *S. cerevisiae* foi avaliada após o preparo do inóculo constituído de fermento M-084 da marca *Mangrove Jacks*<sup>®</sup>, conforme pode ser observada na Tabela 3.

**Tabela 3.** Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* durante as produções de cerveja de baixo teor alcoólico antes da fermentação (inicial) e após a fermentação (final).

	Viabilidade (%)	
	<i>Inicial</i>	<i>Final</i>
Produção 1	94 <sup>a</sup> ± 5	75 <sup>b</sup> ± 9
Produção 2	80 <sup>a</sup> ± 4	77 <sup>a</sup> ± 7
Produção 3	77 <sup>a</sup> ± 5	80 <sup>a</sup> ± 6
Produção 4	85 <sup>a</sup> ± 6	82 <sup>a</sup> ± 4

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam diferença estatística entre início e fim da fermentação de uma mesma produção,  $p < 0,05$ .

O azul de metileno possui carga negativa que é a mesma carga da membrana da célula da levedura. Portanto, quando a célula está viva, o corante não penetra na mesma, corando somente as células não viáveis de azul (61). O balanço entre células viáveis e não viáveis é o que se denomina viabilidade (%). Em geral, a viabilidade apresentou-se superior a 70 % e não houve diferenças antes ou após a fermentação em cada produção (Tabela 3)

com exceção da produção 1. Em trabalho sobre o monitoramento da fermentação de *S.cerevisiae* na produção de cerveja, foram encontrados valores de viabilidade de cerca de 85 % (77).

A viabilidade celular durante a fermentação pode ser afetada pelo estresse nutricional, temperatura de fermentação e pH do mosto. Nas produções de cerveja de baixo teor alcoólico foram disponibilizadas menores quantidade de açúcares e proteínas oriundos do malte, o que poderia afetar a viabilidade. Da mesma forma, o estresse oxidativo deve ser levado em consideração, principalmente nos estágios de propagação e fermentação. No entanto, as leveduras também são capazes de se adaptar a condições que não sejam exatamente as ideais para seu desenvolvimento (78), o que permite uma variação grande de desenhos experimentais e obtenção de produtos finais diversos. No presente trabalho, estas se adaptaram às condições impostas resultando no produto desejado.

Na Tabela 4 podem ser observados os resultados da contagem global de microrganismos nas diferentes produções de cerveja de baixo teor alcoólico.

**Tabela 4.** Contagem global de microrganismos (UFC.mL<sup>-1</sup>) em meio PCA para quatro lotes distintos (P1, P2, P3 e P4), com tratamento térmico (CTT) e sem tratamento térmico (STT).

	P1 (UFC.mL <sup>-1</sup> )	P2 (UFC.mL <sup>-1</sup> )	P3 (UFC.mL <sup>-1</sup> )	P4 (UFC.mL <sup>-1</sup> )
CTT	12,5 <sup>a</sup> ± 3,5	11,0 <sup>a</sup> ± 1,4	10,5 <sup>a</sup> ± 3,5	9,7 <sup>a</sup> ± 3,3
STT	164,0x10 <sup>b</sup> ± 9,9	165,5x10 <sup>b</sup> ± 13,1	169,0x10 <sup>b</sup> ± 9,2	159,2x10 <sup>b</sup> ± 10,8

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) segundo ANOVA com diferenciação das médias entre as produções (P1, P2, P3 e P4) pelo teste de Tukey.

Esta contagem detecta o número de bactérias aeróbias ou facultativas mesófilas (35 a 37 °C) presentes nos alimentos, e é um dos indicadores microbiológicos de qualidade mais comumente utilizados. Foi observada uma drástica redução na contagem de microrganismos após o tratamento térmico (Tabela 4), que consistiu em submeter as amostras a 65°C por 20 minutos, o que equivale de 80 a 120 unidades de pasteurização (UP) já preconizados para o tratamento de cerveja sem álcool ou de baixo teor alcoólico, sendo que quanto menor o teor de etanol, maior o número de UP necessárias para eficácia do tratamento térmico (79).

A RDC nº 12, da ANVISA, de 02 de janeiro de 2001 (80), estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, no entanto, as bebidas alcoólicas não estão incluídas nesta lista. Portanto, a legislação brasileira define que nas bebidas alcoólicas a contagem de microrganismos “não deve estar presente em quantidades superiores aos limites estabelecidos no Regulamento Técnico MERCOSUL correspondente”, descrito na Instrução Normativa 54, do MAPA, de 05 de novembro de 2001 (81).

A contagem de bactérias aeróbias mesófilas em cervejas filtradas e/ou engarrafadas deve ser de no máximo 100 UFC.mL<sup>-1</sup> (82). Assim, as cervejas CTT das quatro produções analisadas encontram-se dentro das recomendações.

## 5.2 COMPARAÇÃO COM AS AMOSTRAS COMERCIAIS DE BEBIDAS

O teor de etanol da cerveja de baixo teor alcoólico produzida foi comparada às amostras comerciais (Tabela 5).

**Tabela 5.** Teor de etanol (% v/v) da cerveja sem álcool produzida e de bebidas comerciais.

	Teor alcoólico % (v/v)
Cerveja baixo teor alcoólico produzida	0,20 <sup>a</sup> ± 0,02
‘Pilsen’	4,66 <sup>b</sup> ± 0,08
Bebida Isotônica	0 <sup>c</sup> ± 0
Cerveja 0,0% (1)	0 <sup>c</sup> ± 0
Cerveja 0,0% (2)	0 <sup>c</sup> ± 0
Cerveja 0,0% (3)	0 <sup>c</sup> ± 0
Cerveja 0,0% (4)	0 <sup>c</sup> ± 0
Cerveja baixo teor alcoólico isotônica	0,26 <sup>d</sup> ± 0,01

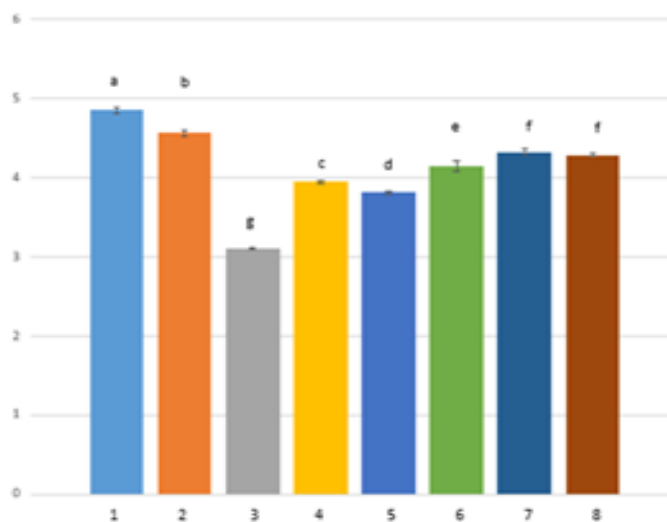
<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey. (1), (2), (3) e (4) indicam marcas diferentes de cerveja tipo 0,0%.

A cerveja de baixo teor alcoólico produzida apresentou teor de etanol de 0,20 % e a cerveja tipo ‘Pilsen’ 4,6 % (Tabela 5). As cervejas sem álcool comerciais não apresentaram variação quanto ao teor de etanol e todas

possuíam teor de 0,0 % (Tabela 5). No tocante às cervejas de baixo teor alcoólico isotônicas, o teor observado para a marca alemã foi de 0,26 %, o que não diferiu da cerveja de baixo teor alcoólico produzida (0,20 %). Desta forma, os valores observados estão dentro do que preconiza o Decreto 6.871, do MAPA, de 04 de junho de 2009 (52), ou seja, teores de até 0,5 % de álcool (v/v). As bebidas isotônicas comerciais também apresentaram 0,0 % de etanol por se tratarem de bebidas não fermentadas (Tabela 5).

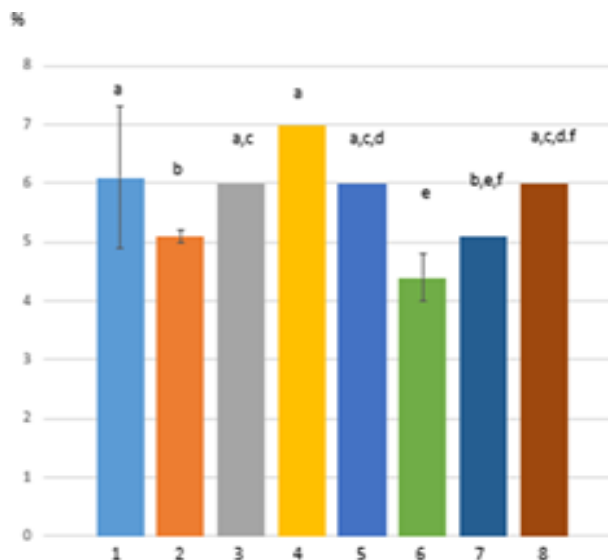
Com relação ao pH (Figura 10), verifica-se que a maioria das bebidas apresentaram pH ácido, ou seja, abaixo de 4,5, com exceção da cerveja de baixo teor alcoólico desenvolvida e da tipo 'Pilsen'. O pH mais baixo foi observado na bebida isotônica em função da presença de acidulante ácido cítrico em sua formulação. Algumas cervejas do tipo sem álcool comerciais apresentaram pH mais baixo que a 'Pilsen'.

**Figura 10.** pH em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, ( $n=4$ ).



Os teores de SST (Figura 11) variaram de 4,0 a 7,0 %. A cerveja ‘Pilsen’ apresentou valores mais baixos de SST visto que a maior parte dos carboidratos solúveis foram convertidos em álcool durante a fermentação (83).

**Figura 11.** SST em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, ( $n=4$ ).



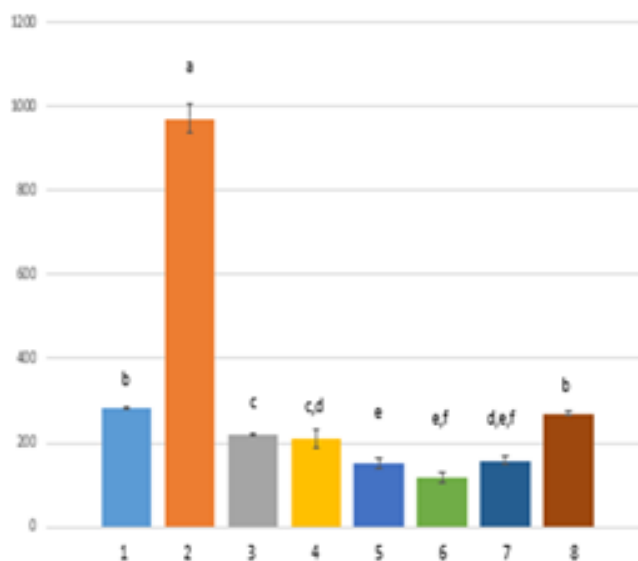
Entre as cervejas sem álcool, houve variação significativa ( $p < 0,05$ ) entre as amostras deste grupo, o que poderia ser explicada pela metodologia que cada indústria utiliza para produzir suas cervejas. Normalmente, há a adoção de um método físico ou biológico ou a combinação de alguns deles (43).

O principal objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um cerveja de baixo teor alcoólico com características isotônicas. Desta forma, foi fundamental a determinação da osmolalidade, pois esta está diretamente relacionada à quantidade de íons dissolvida em uma solução e quanto mais próxima à classificação de “isotônica”, melhor é a absorção da bebida pelo organismo (84). Para verificar se as amostras estavam em conformidade com a RDC nº 18, da ANVISA, de 27 de abril de 2010 (10), as medidas de osmolalidade foram realizadas em osmômetro. Foram consideradas isotônicas as amostras com osmolalidade entre 270 a 330 mOsmol.kg<sup>-1</sup>, conseqüentemente as hipotônicas abaixo de 270 mOsmol.kg<sup>-1</sup> e as hipertônicas acima de 330 mOsmol.kg<sup>-1</sup>.

Os resultados obtidos (Figura 12) apontaram que as bebidas isotônicas comerciais encontravam-se na faixa de bebida hipotônica com osmolalidade

correspondente a  $219 \pm 4$  mOsmol.kg<sup>-1</sup> e, portanto, sua osmolalidade coincidiu mais com a encontrada na cerveja tipo 0,0% (1) ( $209 \pm 23$  mOsmol.kg<sup>-1</sup>).

**Figura 12.** Osmolalidade (mOsmol.kg<sup>-1</sup>) em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, (n=4).



As demais cervejas 0,0% também foram classificadas como hipotônicas, sendo suas osmolalidades correspondentes a  $150 \pm 12$  mOsmol.kg<sup>-1</sup> para a cerveja 0,0% (2),  $119 \pm 12$  mOsmol.kg<sup>-1</sup> para a cerveja 0,0% (3) e  $159 \pm 9$  mOsmol.kg<sup>-1</sup> para a cerveja 0,0% (4).

A cervejas isotônicas desenvolvida e alemã, obtiveram resultados dentro da faixa preconizada para bebida isotônica, ou seja,  $282 \pm 3$  e  $270 \pm 4$  mOsmol.kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Enquanto a cerveja tipo ‘Pilsen’ apresentou-se hipertônica ( $971 \pm 33$  mOsmol.kg<sup>-1</sup>) e portanto seria a opção menos recomendada para o consumo pós atividade física. Possivelmente a presença de etanol foi responsável pelo aumento da osmolalidade neste grupo (85).

Ao avaliarem 24 marcas de bebidas destinadas a praticantes de atividades físicas comercializadas na Suíça (85), notaram grande variação na osmolalidade das mesmas, ou seja, uma faixa compreendida entre 157 a 533 mOsmol.kg<sup>-1</sup>. Uma das marcas avaliadas foi a mesma utilizada neste trabalho, também em quatro lotes diferentes e foram obtidas osmolalidades superiores a 348 mOsmol/kg<sup>-1</sup>. A osmolalidade de uma bebida pode influenciar a taxa de

esvaziamento gástrico e fluxo de água intestinal (8,86). As soluções hipotônicas promovem o esvaziamento gástrico e a absorção de água do intestino delgado proximal (8), enquanto as soluções hipertônicas retardam o esvaziamento gástrico e a absorção de líquidos, (87,88). Também é relatado que a palatabilidade aumenta com a diminuição da osmolalidade (89) e, assim, promove o consumo voluntário (87).

Já os resultados para a determinação dos teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  nas amostras de cervejas e bebidas isotônicas, são apresentados na Tabela 6.

**Tabela 6.** Teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  para amostras de bebida isotônica, cervejas “Pilsen”, baixo teor alcoólica isotônicas e tipo 0,0%.

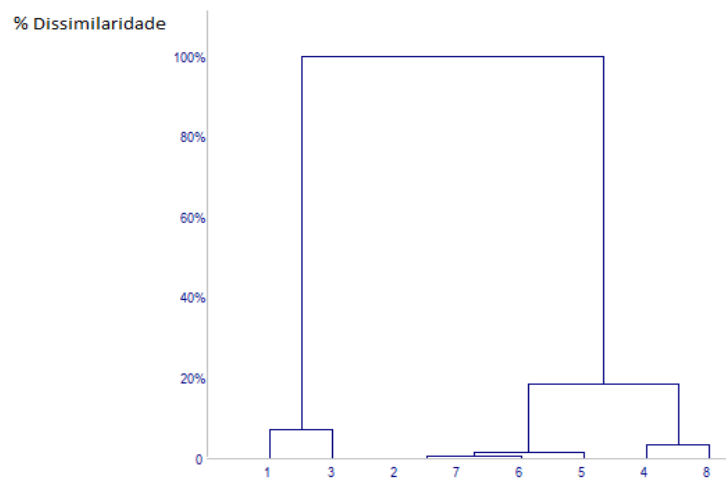
<b>Amostras</b>	<b><math>\text{K}^+</math> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b><math>\text{Na}^+</math> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
Desenvolvida	134 ± 10	522 ± 12
Pilsen'	-	-
Bebida Isotônica	147 ± 6	497 ± 5
0,0% (1)	-	130 ± 2
0,0% (2)	-	11 ± 4
0,0% (3)	-	5 ± 3
0,0% (4)	-	-
Baixo teor álcool isotônica	-	106 ± 4

Resultados indicam o valor da média e seu respectivo desvio padrão, (n=4).

Assim como já esperado, a cerveja convencional e de baixo teor alcoólico comerciais não apresentam teores significativos de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  para serem consideradas bebidas isotônicas. Já a cerveja comercial de baixo teor alcoólico isotônica apresentou cerca de cinco vezes menos Na que a bebida isotônica e cerveja de baixo teor alcoólica desenvolvida. Portanto, somente a bebida isotônica e a cerveja desenvolvida apresentaram teores que estão dentro da faixa preconizada para bebidas isotônicas, ou seja, até 700 mg.L<sup>-1</sup> para o  $\text{K}^+$  e 460 a 1150 mg.L<sup>-1</sup> para o  $\text{Na}^+$  (10). Utilizou-se a análise de *cluster* por meio da distância euclidiana completa para a aglomeração das amostras para visualização de eventuais diferenças e semelhanças entre os grupos de bebidas, com relação aos teores de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ . Neste caso, houve a formação de dois blocos que foram 100% diferentes entre si. A cerveja de baixo teor alcoólico com propriedades isotônicas desenvolvida teve maior similaridade

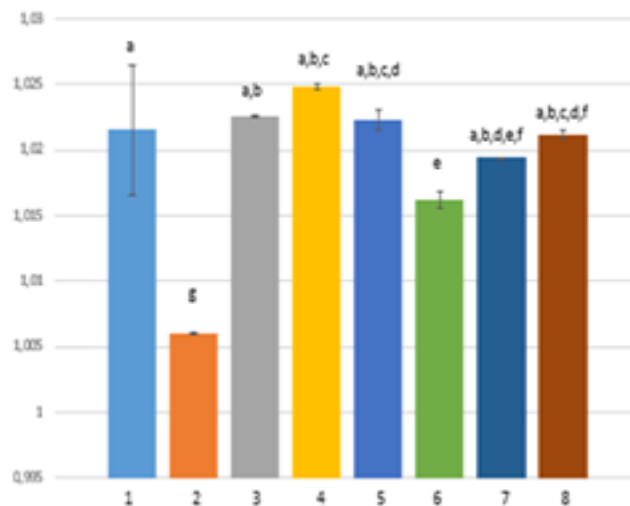
com as bebidas isotônicas, enquanto as demais cervejas apresentaram cerca de 80% de similaridade entre elas, com exceção da cerveja 'Pilsen' (Figura 13).

**Figura 13.** Dendrograma para análise de grupos de bebida em relação à determinação de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  ( $\text{mg.L}^{-1}$ ). Eixo horizontal representado pela distância euclidiana por método de agregação completa. Amostras: 1 cerveja de baixo teor alcoólico desenvolvida; 2 "Pilsen"; 3 bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7 cervejas do tipo 0,0%; 8 cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.



Já em relação à densidade das bebidas, houve diferença estatística ( $p < 0,05$ ) entre as amostras avaliadas, sendo a diferença atribuída principalmente a cerveja tipo 'Pilsen' que apresentou valores de densidade bastante inferiores às demais bebidas (Figura 14).

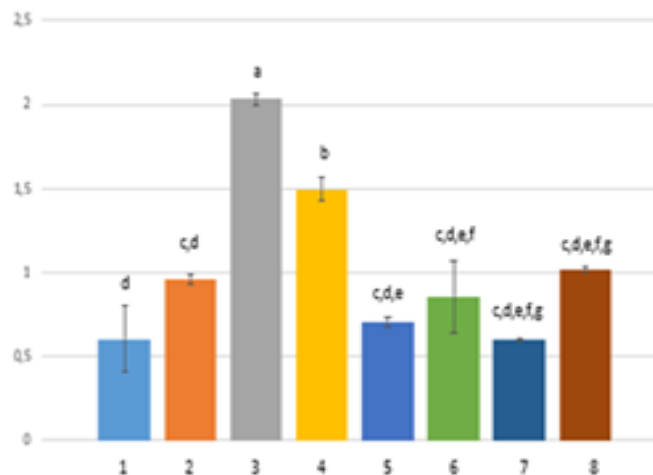
**Figura 14.** Densidade ( $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ ) em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, ( $n=4$ ).



Este resultado se deve ao maior teor de etanol nesta cerveja (4,6 % v/v), o que resulta em menores densidades (90).

Em relação a AT (Figura 15), em função da presença do acidulante ácido cítrico em sua formulação, os maiores teores foram observados na bebida isotônica comercial ( $2,03 \pm 0,03 \text{ mEq}\cdot\text{L}^{-1}$ ), o que está de acordo com os valores baixos de pH (Figura 10).

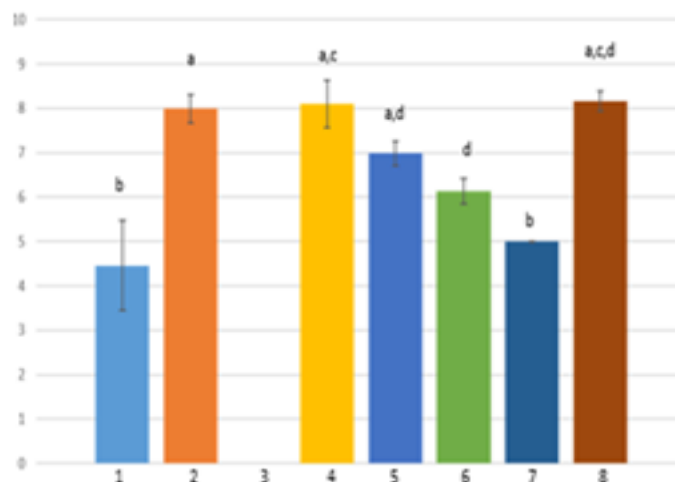
**Figura 15.** ATT (mEq.L<sup>-1</sup>) em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, (n=4).



As cervejas apresentaram grande variação nos teores de AT, porém sem diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), principalmente quando se comparam as cervejas tipo 0,0% e baixo teor alcoólico isotônicas. Todavia, a cerveja comercial sem álcool (1) foi a mais ácida ( $1,50 \pm 0,07$  mEq.L<sup>-1</sup>), Figura 12A. Assim, todas as cervejas analisadas apresentaram AT inferior a  $1,65$  mEq/L<sup>-1</sup>, o que as coloca neste contexto como mais agradáveis ao paladar em comparação com cervejas notadamente ácidas ( $> 1,9$  mEq.L<sup>-1</sup>) (73).

No tocante à coloração das bebidas, a classificação de cor em unidades EBC (*European Brewery Convention*) excluiu a análise de amostras de bebida isotônica, por se tratar de uma escala de cor do ramo cervejeiro (51). Todas as bebidas avaliadas apresentaram menos de nove unidades EBC, incluindo a cerveja de baixo teor alcoólico desenvolvida (Figura 16).

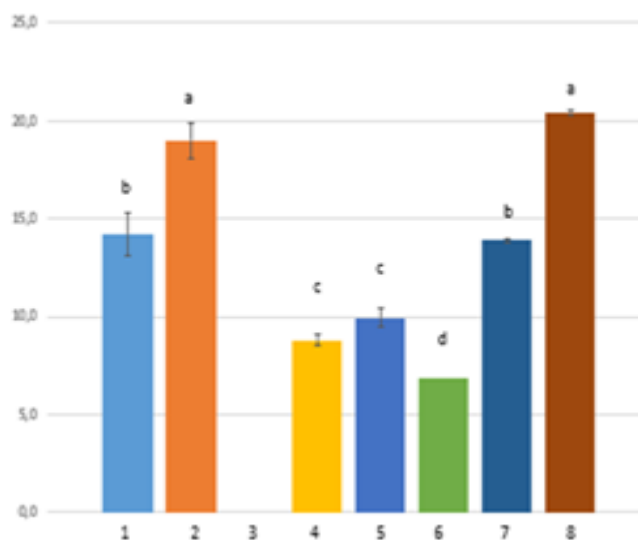
**Figura 16.** Cor (EBC) em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, ( $n=4$ ).



Desta forma, todas as amostras analisadas estavam de acordo com o Decreto 6.871, do MAPA, de 04 de junho de 2009 (52), que dispõe que as cervejas claras devem corresponder a menos que vinte unidades EBC.

Para as análises de amargor também foram excluídas as amostras de bebida isotônica, haja vista que não possuem lúpulo em sua formulação e o amargor é obtido pela quantificação dos iso- $\alpha$ -ácidos totais por técnicas espectrofotométricas, após sua extração por solventes, expressando sua concentração em *International Bitterness Units* (IBU). Os maiores valores de amargor foram observados na cerveja tipo 'Pilsen' ( $19,0 \pm 0,9$  IBU) e na cerveja sem álcool isotônica ( $20,4 \pm 0,1$  IBU), sendo que as demais cervejas sem álcool apresentaram valores significativamente inferiores (Figura 17).

**Figura 17.** Amargor (IBU) em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, ( $n=4$ ).



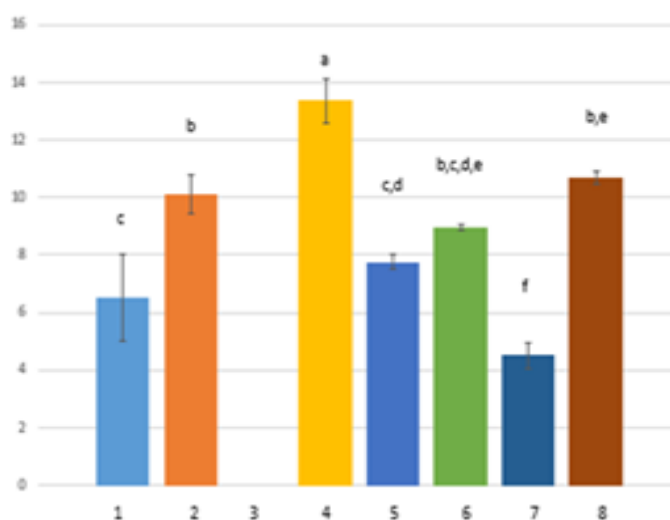
Contudo, a percepção de amargor não depende somente do número de unidades IBU, alguns autores sugerem que o teor de etanol e o retrogosto das cervejas também podem afetar a percepção do amargor (54).

Em relação aos compostos fenólicos, os maiores teores foram observados na cerveja comercial sem álcool (1) ( $13,4 \pm 0,8 \text{ g.L}^{-1}$ ), cerveja tipo de baixo teor alcoólico isotônica ( $10,8 \pm 0,3 \text{ g.L}^{-1}$ ) e ‘Pilsen’ ( $10,2 \pm 0,4 \text{ g.L}^{-1}$ ) Figura 18. Altos índices apresentados pela marca 1 de cerveja 0,0%, podem ser explicados pela presença de um antioxidante, metabissulfito de sódio (INS-223), que estava ausente nas demais amostras, obtendo-se assim uma superestimação de valores para este grupo.

Já a cerveja do tipo baixo teor alcoólico isotônica apesar de conter somente 0,26 % de álcool, apresentou os mesmos teores de fenólicos da ‘Pilsen’, o que poderia ser explicado pelo lúpulo que também é responsável pelo incremento de fenólicos. O lúpulo contribui com aproximadamente um terço do total de compostos fenólicos da cerveja (91). Outro fator que contribui para seu incremento é o etanol que pode solubilizar os compostos fenólicos da matéria-prima durante o processo de produção (92). Grande parte destes compostos é proveniente do malte de cevada, adjuntos de malte e lúpulo. Nas

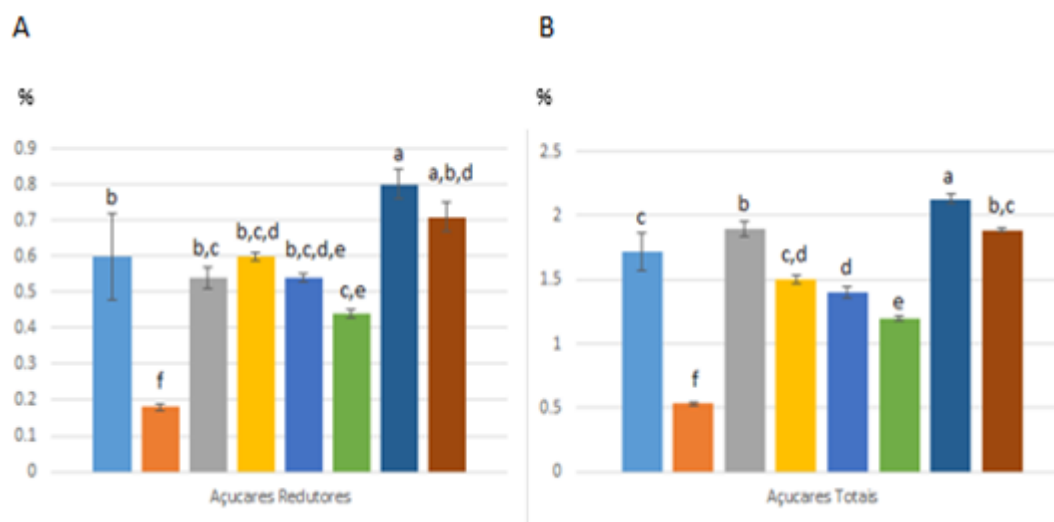
cervejas tipo 'Pilsen', isotônica produzida e alemã, os compostos fenólicos são oriundos do malte de cevada e do lúpulo, por se tratarem de cervejas puro malte. Vale destacar que os mesmos não foram detectados em amostras de bebida isotônica (Figura 18). Desta forma, as cervejas são mais ricas nestes compostos, o que configura uma vantagem para sua ingestão perante as bebidas isotônicas.

**Figura 18.** Compotos fenólicos (mg ácido gálico.L<sup>-1</sup>) em oito grupos de bebidas: 1-cerveja desenvolvida; 2-"Pilsen"; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7-cervejas 0,0%; 8-cerveja de baixo teor alcoólico isotônica.<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey, (n=4).



Quanto ao teor de açúcares, o grupo da cerveja 'Pilsen' foi o único que apresentou teores significativamente inferiores de açúcares totais ( $0,53 \pm 0,01$  g.L<sup>-1</sup>) e redutores ( $0,18 \pm 0,01$  g.L<sup>-1</sup>) em função de seu processo de fermentação. Enquanto a cerveja desenvolvida apresentou o mesmo perfil da cerveja isotônica de marca alemã com relação a ambos os perfis de açúcares. No entanto, somente a de marca alemã apresenta equivalência em relação aos teores de açúcares totais quando comparada à bebida isotônica comercial (Figura 19).

**Figura 19.** (A) açúcares redutores (%) e (B) totais em 8 amostras de bebidas: 1- cerveja desenvolvida; 2-“Pilsen”; 3-bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7 cervejas 0,0%; 8- cerveja de baixo teor alcoólico isotônica. Barras verticais indicam o desvio padrão da média. <sup>a,b,c</sup> Letras diferentes indicam que há diferença significativa entre os valores ( $p < 0,05$ ) submetidos à análise de variância (ANOVA) e diferenciação das médias pelo teste de Tukey ( $n=4$ ).

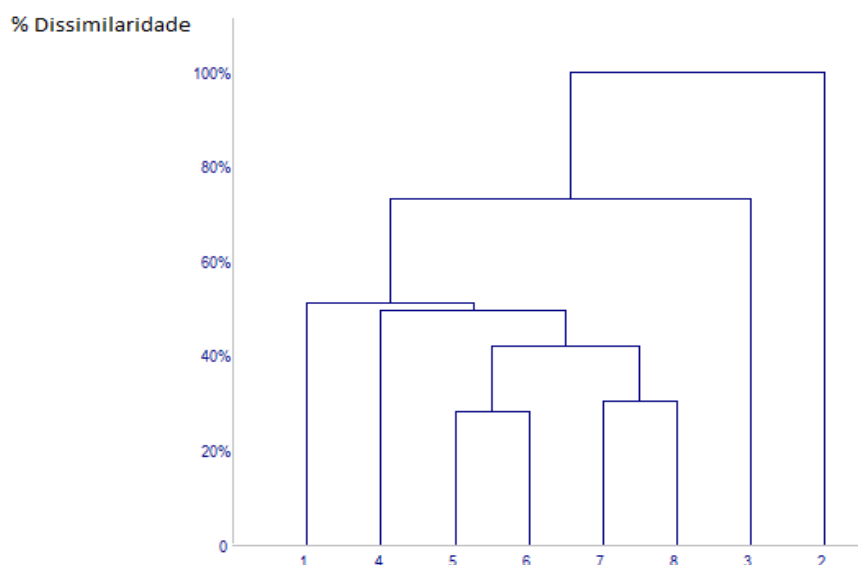


Durante a mosturação, as enzimas presentes nos grãos de malte de cevada são ativadas convertendo o amido em açúcares mais simples, como glicose, maltose e dextrinas (93). Diferentes rampas de mosturação fornecem quantidades distintas de açúcares fermentescíveis que são metabolizados pelas leveduras transformando-os em piruvato e, conseqüentemente em etanol e CO<sub>2</sub> (94). No caso das cervejas de baixo teor alcoólico produzidas, as modificações podem ter levado a uma menor fermentação do mosto o que resultou em valores mais elevados de açúcares. Já a bebida isotônica comercial, apresentou teores elevados de açúcares ( $1,90 \pm 0,09 \text{ g.L}^{-1}$ ), pela adição de sacarose e maltodextrina em sua formulação.

### 5.3 ANÁLISE DE CLUSTERS

A análise de cluster foi realizada também com todos os parâmetros físico-químicos avaliados nos oito grupos de amostras de bebidas (Figura 20). Para isso, esta análise foi executada usando a distância euclidiana, ligação completa e standardização das amostras.

**Figura 20.** Dendrograma com distância euclidiana, ligação completa e estandardização de 8 grupos de amostras de bebidas: Amostras: 1 cerveja de baixo teor alcoólico desenvolvida; 2 “Pilsen”; 3 bebida isotônica; 4; 5; 6 e 7 cervejas do tipo 0,0%; 8 cerveja com baixo teor alcoólico isotônica. Foram avaliados parâmetros físico-químicos (potencial hidrogênionico (pH), teor de sólidos solúveis (SST %), osmolalidade (mOsmol.kg<sup>-1</sup>), densidade (g.cm<sup>-3</sup>), acidez titulável (mEq.L<sup>-1</sup>); cor (EBC); amargor (IBU); compostos fenólicos (mg.L<sup>-1</sup> ácido gálico), açúcares redutores (%) e totais (%), determinação de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (mg.L<sup>-1</sup>) n=4.



verificou-se que a cerveja ‘Pilsen’ não apresentou similaridade com as demais cervejas em relação aos parâmetros físico-químicos avaliados, enquanto as bebidas isotônicas, apresentaram quase 20% de similaridade com as demais cervejas de baixo teor alcoólico e tipo 0,0%. Tanto a cerveja de baixo teor alcoólico desenvolvida quanto a de uma das marcas de cerveja 0,0% (1), apresentam cerca de 50% de similaridade com as demais cervejas tipo 0,0% e baixo teor alcoólico isotônica. Já as cervejas 0,0% (2) 0,0% (3), 0,0% (4) e a cerveja isotônica de baixo teor alcoólico comercial apresentaram maior similaridade entre elas (cerca de 70%). A distância no eixo X entre as amostras de cerveja de baixo teor alcoólico desenvolvida e a isotônica de baixo teor alcoólico comercial, mostrou que existe maior similaridade desta última com a cerveja tipo 0,0% (4) do que com a cerveja desenvolvida (Figura 16).

Foi realizado um trabalho de comparação entre bebidas isotônicas e cervejas, incluindo as de baixo teor alcoólico (95). Foi observado que nenhuma cerveja atingiu valores recomendados de 0,5 g.L<sup>-1</sup> de sódio. A maioria das cervejas de baixo teor alcoólico (0,2 a 0,5 % v/v), era isotônica porém, como tratavam-se de bebidas gaseificadas (CO<sub>2</sub>), após a ingestão, com ação dos

ácidos estomacais, as bebidas passaram a faixa de hipotônicas. Enquanto as cervejas convencionais foram classificadas como hipertônicas. Desta forma, verificam-se resultados similares corroborando o que foi verificado no presente trabalho.

#### 5.4 ANÁLISE SENSORIAL

Foi empregado o teste de aceitação, método afetivo com julgadores não treinados, porém a maioria era constituída de consumidores de cerveja (45,2%), de bebida isotônica (17,4%) ou de ambos (33,0%). Os julgadores contituiram-se de pessoas do sexo feminino (60,0%) e masculino (40,0%), com idade média de  $26 \pm 7$  anos. O grupo que relatou fazer atividade física três ou mais vezes por semana foi de 33,0%, seguidos pelos que fazem atividade física uma ou duas vezes por semana (28,7%). Portanto, observou-se que os grupos que faziam pelo menos algum tipo de atividade física durante a semana (61,7%) eram a maioria, enquanto os julgadores que disseram que não faziam nenhum tipo de atividade constituíram 38,3% dos julgadores. Por se tratar de um produto em que não há exclusividade de um grupo específico para seu consumo, consideraram-se válidas todas as avaliações.

##### 5.4.1 Teste de Aceitação

As médias das notas para os atributos do teste de aceitação estão apresentados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Média das notas de aceitação de amostras de cervejas sem álcool e baixo teor alcoólico para os atributos aparência, aroma, textura, sabor e impressão global.

Atributo	0,0% (1)	0,0% (2)	Desenvolvida
Aparência	7,65 <sup>ns</sup>	7,10 <sup>ns</sup>	6,62 <sup>ns</sup>
Aroma	6,42 <sup>ns</sup>	6,01 <sup>ns</sup>	6,84 <sup>ns</sup>
Sabor	6,55 <sup>ns</sup>	6,17 <sup>ns</sup>	5,90 <sup>ns</sup>
Impressão Global	6,69 <sup>ns</sup>	6,27 <sup>ns</sup>	6,32 <sup>ns</sup>

ns: não significativo. Médias não diferem entre si pela ANOVA com diferenciação de médias pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Os resultados indicaram que não houve diferença significativa entre as três amostras de cervejas para todos os atributos avaliados, já que o valor obtido após execução de ANOVA com diferenciação das médias pelo teste de Tukey foi  $p > 0,05$ .

Apesar da cerveja de baixo teor alcoólico desenvolvida ter apresentado maior média para o atributo aroma, pode-se dizer que estatisticamente este dado não se confirma e portanto, todas as cervejas apresentam a mesma percepção pelo consumidor com relação aos atributos aparência, aroma, sabor e impressão global. Em geral, praticamente todas as cervejas foram avaliadas com médias próximas a 6, que estão representadas na escala hedônica como “gostei ligeiramente” ou “gostei moderadamente”.

Quanto aos comentários dos julgadores relatados na ficha empregada para as análises, verificou-se que apesar da cerveja ‘Pilsen’ estar ausente nesta análise, a memória que os julgadores apresentaram para atribuir notas às cervejas do tipo 0,0% ou baixo teor alcoólico estava relacionada ao quão similar estas amostras são da cerveja ‘Pilsen’. Frases como: “Cerveja muito parecida com cervejas com álcool” deixam claro que o consumidor busca o mesmo sabor da cerveja convencional na cerveja sem álcool e portanto a rejeição sofrida por tais produtos pode ser justificada pela ausência de similaridade entre as cervejas com e sem álcool ou de baixo teor alcoólico com relação à aparência, sabor, aroma e impressão global.

Outro comentário frequente foi a comparação do “corpo” da cerveja sem álcool ou de baixo teor alcoólico em relação à cerveja convencional. Dado que todas as cervejas apresentadas aos julgadores nesta análise sensorial foram classificadas como “leve”, ou seja, apresentam segundo o Decreto 6.871, do MAPA, de 4 de junho de 2009 (52) extrato primitivo maior ou igual a cinco por cento em peso e menor que dez e meio por cento em peso. Estas foram interpretadas pelos julgadores como “aguadas”, de “leve amargor” ou “adição de água na bebida”.

Comentários positivos também estiveram presentes em todas as amostras. Destacando-se na cerveja desenvolvida os comentários: “bom adocicado no final”, “tem potencial”, “mais agradável ao paladar”, “sabor lembra muito a uma cerveja ‘Pilsen’”, “muito gostosa”. Já na cerveja 0,0% (1), destacaram-se os comentários: “bem próxima à cerveja com álcool”, sabores

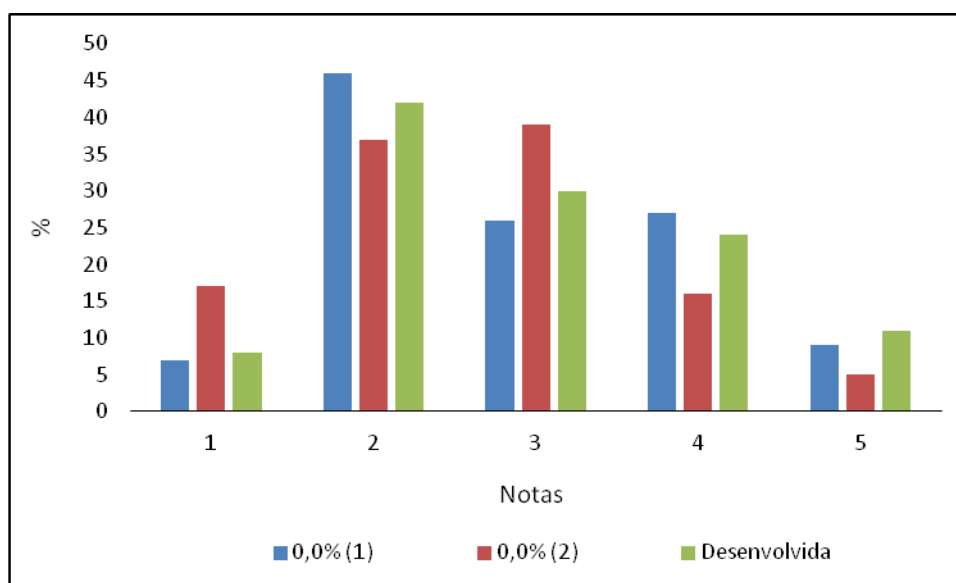
mais impactantes que as demais”. Enquanto para a cerveja 0,0% (2): “aproximou-se de cervejas tradicionais”, “muito bom”, “delicada e agradável”.

Durante o processo de desalcoolização da cerveja, podem ocorrer perdas de compostos voláteis, ésteres e aldeídos. Também na cerveja de baixo teor alcoólico produzida, a retirada precoce da levedura quando comparada à produção de uma cerveja convencional ‘Pilsen’, evita que esta possa agregar sabores e compostos voláteis inerentes ao processo de fermentação (4). De qualquer forma, todas as cervejas tiveram em geral, boa aceitação por parte dos julgadores e a adição de sais à formulação da cerveja de baixo teor alcoólico com propriedades isotônicas produzida não foi significativa para a aceitação do produto e tampouco prejudicou o sensorial quando comparada às duas marcas de cervejas comerciais do tipo 0,0%.

#### 5.4.2. *Intenção de compra*

Os resultados do teste de intenção de compra estão apresentados na Figura 21.

**Figura 21.** Frequência de intenção de compra de consumidores para amostras de cerveja sem álcool comerciais [0,0% (1) e 0,0% (2)] e baixo teor alcoólico desenvolvida. Nota 5: certamente não compraria, nota 4: provavelmente não compraria; nota 3: tenho dúvidas; nota 2: provavelmente compraria e nota 1: certamente compraria.

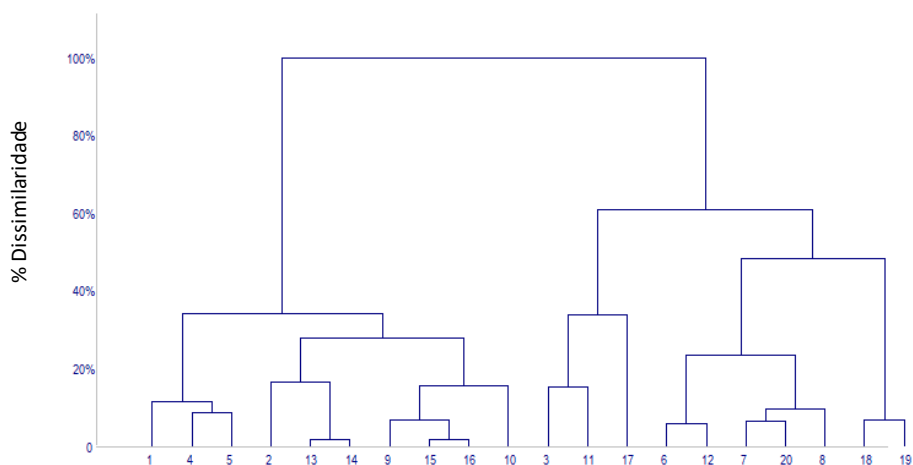


A cerveja 0,0% (2) foi a que apresentou maior frequência de nota traduzida como “certamente compraria”. No entanto, os dados não diferiram estatisticamente quando realizado o teste de variância (ANOVA) com diferenciação das médias pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). Assim, a maioria dos julgadores avaliam a intenção de compra das três amostras apresentadas entre “provavelmente compraria” e “tenho dúvidas”. Em geral, todas as amostras receberam atribuições mais positivas que negativas. A maioria dos julgadores atribuiu valores entre 1 a 3 que são traduzidos como “certamente compraria” a “tenho dúvidas”, respectivamente.

## **6 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE CEPAS *Saccharomyces* E NÃO-*Saccharomyces* COM POTENCIAL PARA PRODUÇÃO DE CERVEJAS DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO**

A avaliação do perfil das diferentes cepas foi realizada após a determinação dos parâmetros de habilidade fermentativa (açúcares), atividade de catalase e estresse oxidativo. Para avaliação do perfil das leveduras, executou-se a análise de *cluster* pelo método da distância entre classes de variância mínima (Ward) (44) utilizando a distância euclidiana e a standardização das variáveis de 20 amostras. Das quais foram representadas pelas seguintes cepas: 1) P4 (*Saccharomyces cerevisiae*); 2) Sc5-25 (*Saccharomyces cerevisiae*), 3) TA4-10 (*Saccharomyces cerevisiae*), 4) Sb (*Saccharomyces boulardii*), 5) CD-2 (*Saccharomyces cerevisiae*), 6) M5-15 (*Saccharomyces cerevisiae*), 7) LL-1 (*Saccharomyces cerevisiae*), 8) 4LBI-3 (*Saccharomyces cerevisiae*), 9) M4 (*Saccharomyces cerevisiae*), 10) CA-10 (*Saccharomyces cerevisiae*), 11) Ba215 (*Saccharomyces cerevisiae*) 12) M3-59 (*Saccharomyces cerevisiae*), 13) E-16 (*Saccharomyces cerevisiae*), 14) LC2-1 (*Torulasporea delbrueckii*), 15) 365 (*Torulasporea delbrueckii*) 16) 425 (*Torulasporea delbrueckii*), 17) CR1 (*Zygosaccharomyces bailii*), 18) TSF (*Candida zemplinina*), 19) SNM-2 (*Candida zemplinina*), 20) EC-1118 (*Saccharomyces cerevisiae*) (Figura 22).

**Figura 22.** Dendrograma com método de distância entre classes de variância mínima (Ward), distância euclidiana e estandardização das variáveis (maltose dia 14, catalase, estresse oxidativo após 48h com peróxido a 250 mM) de 20 grupos que correspondem às cepas de leveduras a seguir: 1) P4 (Sc); 2) Sc5-25 (Sc), 3) TA4-10 (Sc), 4) Sb (*Saccharomyces boulardii*), 5) CD-2 (Sc), 6) M5-15 (Sc), 7) LL-1 (Sc), 8) 4LBI-3 (Sc), 9) M4 (Sc), 10) CA-10 (Sc), 11) Ba215 (Sc) 12) M3-59 (Sc), 13) E-16 (Sc), 14) LC2-1 (Td), 15) 365 (Td) 16) 425 (Td), 17) CR1 (Zb), 18) TSF (Cz), 19) SNM-2 (Cz), 20) EC-1118 (Sc), n=3.

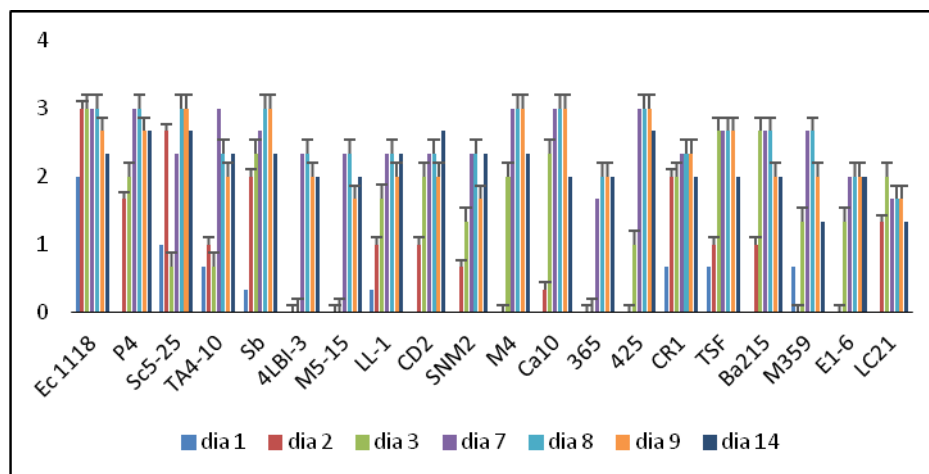


Pode-se verificar que houve a formação de dois grandes grupos, sendo um grupo constituído pelas cepas de 1 a 10 (à esquerda) com nível de dissimilaridade de aproximadamente 40%, e outro grupo constituído pelas amostras de 3 a 19 (à direita). Para este grupo, o índice de dissimilaridade de aproximadamente 60% (Figura 22).

Desta forma, as cepas cujos parâmetros avaliados se assemelharam em cerca de 60% foram: 1) P4 (*Saccharomyces cerevisiae*); 2) Sc5-25 (*Saccharomyces cerevisiae*), 4) Sb (*Saccharomyces boulardii*), 5) CD-2 (*Saccharomyces cerevisiae*), 9) M4 (*Saccharomyces cerevisiae*), 13) E-16 (*Saccharomyces cerevisiae*), 14) LC2-1 (*Torulaspora delbrueckii*), 15) 365 (*Torulaspora delbrueckii*) 16) 425 (*Torulaspora delbrueckii*). Quanto ao outro grupo, com índice de similaridade foi de aproximadamente 40%: 3) TA4-10 (*Saccharomyces cerevisiae*), 11) Ba215 (*Saccharomyces cerevisiae*), 17) CR1 (*Zygosaccharomyces bailii*), 6) M5-15 (*Saccharomyces cerevisiae*), 7) LL-1 (*Saccharomyces cerevisiae*), 8) 4LBI-3 (*Saccharomyces cerevisiae*), 12) M3-59 (*Saccharomyces cerevisiae*), 18) TSF (*Candida zemplinina*), 19) SNM-2 (*Candida zemplinina*), 20) EC-1118 (*Saccharomyces cerevisiae*).

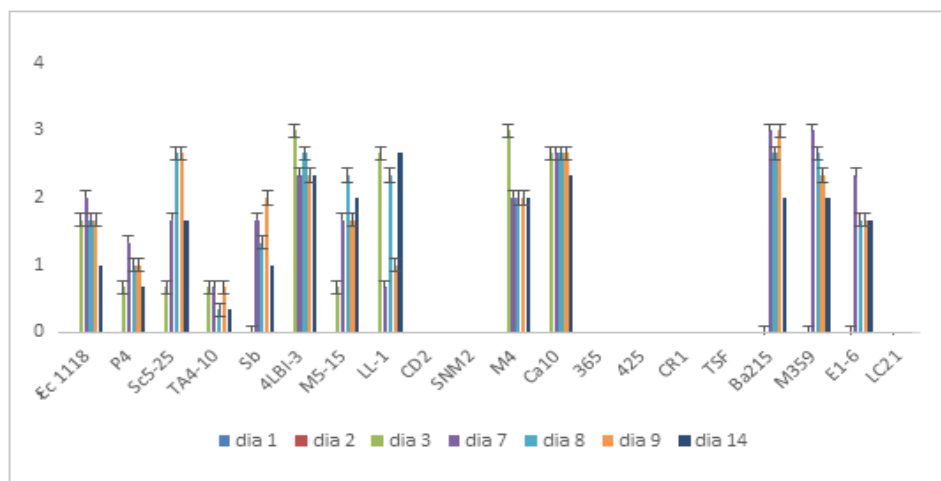
Pode-se observar que em ambos os grupos houve a presença de cepas *Saccharomyces* e não *Saccharomyces*. Desta forma, ao se utilizar os parâmetros avaliados (catalase e estresse oxidativo), não foi possível fazer a diferenciação entre o gênero das cepas. Portanto, um dos parâmetros importantes para a seleção de cepas para a fermentação mista foi o consumo de maltose, já que todas as leveduras avaliadas apresentam capacidade para assimilar a glicose como principal fonte de carbono (Figura 23).

**Figura 23.** Açúcares (glicose) segundo o teste de Duhran. A presença de bolha é relatada como forte (3), fraco (2), fraquíssimo (1) ou ausente (0) nos dias 1, 2, 3, 7, 8, 9 e 14. Barras indicam desvio padrão da média (n=3).



No entanto, nem todas apresentam a mesma capacidade para assimilação de maltose (Figura 24).

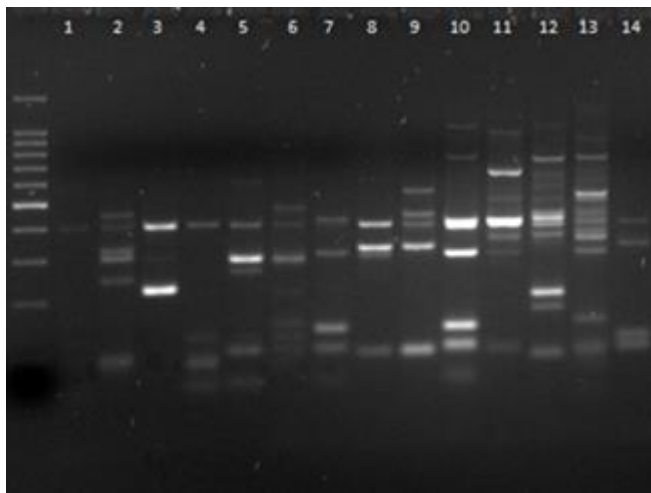
**Figura 24.** Açúcares (maltose) segundo o teste de Duhran. A presença de bolha é relatada como forte (3), fraco (2), fraquíssimo (1) ou ausente (0) nos dias 1, 2, 3, 7, 8, 9 e 14. Barras indicam desvio padrão da média (n=3).



Tendo em vista que a maltose é o açúcar mais abundante no mosto, contribuindo com cerca de 50 a 60% do total de açúcares, se houver cepas que não o aproveitem para a produção de etanol, este deve manter-se a níveis inferiores às das cervejas convencionais, ou seja, menos que 4,5 % (v/v). Obviamente, outros fatores são importantes para o crescimento e desenvolvimento das leveduras tais como presença ou ausência de oxigênio,

diferentes tipos de cepas, composição do mosto, etc. (45). Também foi levada em consideração a eleição de pelo menos uma cepa de cada gênero no caso das cepas não *Saccharomyces*. Com o intuito de comprovar a identidade das cepas *Saccharomyces*, utilizou-se a amplificação interdelta como um método de avaliação de cepas que permitiu que estas pudessem ser identificadas não só antes como durante a fermentação, constituindo-se de um método simples, rápido e reprodutível pela extração de DNA de cada cepa. O gel de eletroforese (Figura 25) permitiu a visualização das cepas com diferenciação das mesmas segundo o padrão das bandas de cada cepa. No caso da produção de vinhos e bioetanol, antes e/ou durante o processo fermentativo, verifica-se a identidade das cepas como um parâmetro de qualidade (96,97). No entanto, no caso da cerveja artesanal tal procedimento ainda não faz parte da rotina de monitoramento de fermentação.

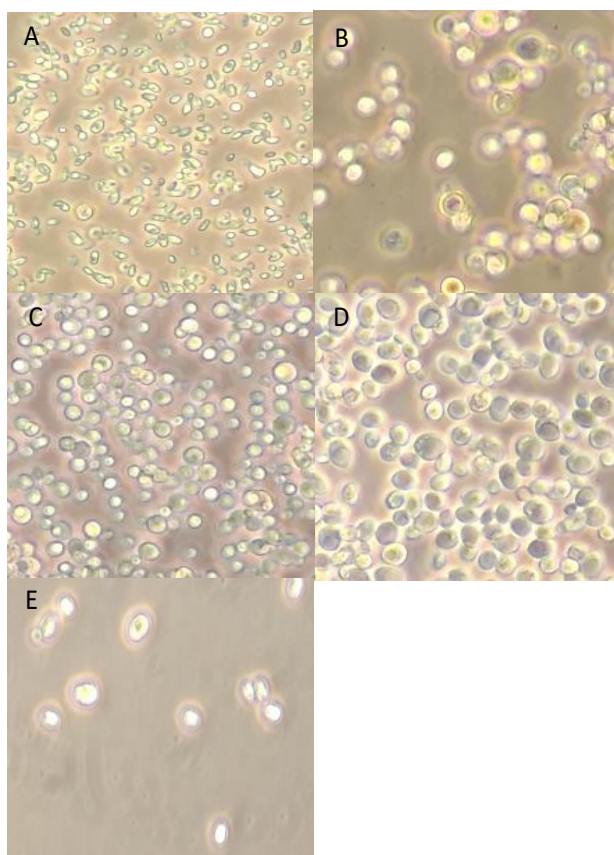
**Figura 25.** Padrões de bandas de amostras de DNA de cepas *Saccharomyces cerevisiae* avaliadas em gel de agarose submetido a PCR: 1) Ec-1118, 2) P4, 3) CD2, 4) 4LBI-3, 5) Sb ,6) LL-1, 7) Sc5-25, 8) CA10, 9) TA4-10, 10) E1-6, 11) Ba-215, 12) M4, 13) M5-15, 14) M3-59. À esquerda, marcador com pares de base (ng). Fonte: Autoria própria.



## 7 FERMENTAÇÃO EM ESCALA DE LABORATÓRIO COM CULTURAS MISTAS

Após a avaliação das cepas, procedeu-se a fermentação utilizando-se *Saccharomyces cerevisiae* (*starter*) como controle e fermentações mistas com a cepa P4 e outras não *Saccharomyces* (CR1, LC2-1, TSF) (Figura 26).

**Figura 26.** Cepas *Saccharomyces* obtidas de lâminas com aumento de 40 X ao microscópio (A) *Candida zemplinina* (TSF), (B) *starter* 'Pilsen', (C) *Torulasporea delbrueckii* (LC2-1) (D) *Saccharomyces cerevisiae* P4, (E) *Zygosaccharomyces bailii* (CR1) utilizadas em fermentação mista ou controle. Fonte: Autoria própria.



A viabilidade em meio ágar nutriente WL também foi realizada no tempo zero da fermentação (momento inoculação) e também após a conclusão do processo fermentativo, ou seja, com a cerveja pronta após a maturação. Os resultados são mostrados na Tabela 8.

**Tabela 8.** Viabilidade em meio WL nutriente no início da fermentação e final da maturação para cinco grupos de fermentação (Pilsen, P4, P4+CR1, P4+LC2-1, P4+TSF).

	<i>Início</i> (UFC.mL <sup>-1</sup> )	<i>Final</i> (UFC.mL <sup>-1</sup> )
<b>Pilsen</b>	1,4 <sup>a</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,3	4,6 <sup>b</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,3
<b>P4</b>	1,0 <sup>a</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,2	7,2 <sup>b</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,4
<b>P4+CR1</b>	6,2 <sup>a</sup> ×10 <sup>6</sup> ±0,5	3,0 <sup>b</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,2
<b>P4+LC2-1</b>	1,3 <sup>a</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,2	3,9 <sup>b</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,2
<b>P4+TSF</b>	5,8 <sup>a</sup> ×10 <sup>6</sup> ±0,4	1,2 <sup>b</sup> ×10 <sup>7</sup> ±0,2

<sup>a,b</sup> Letras diferentes indicam significância estatística ( $p < 0,05$ ) segundo ANOVA com diferenciação das médias entre início e final do mesmo grupo pelo teste de Tukey.

Após a conclusão da maturação, 15 dias a temperatura de 20°C e mais 15 dias em temperatura de 10°C, conforme instrução do fabricante do malte (Mr. Malto, Itália). Foram efetuadas análises para a avaliação final da viabilidade em meio WL nutriente, assim como a produção de etanol e de metabólitos secundários.

Em relação à viabilidade, houve manutenção ou aumento de células viáveis, verificadas pela contagem do número de colônias em meio WL nutriente. Ou seja, as leveduras adaptaram-se ao meio, no caso o mosto cervejeiro, em virtude deste apresentar condições favoráveis como pH entre 4 e 6, temperatura e nutrientes necessários ao seu desenvolvimento. Apesar do metabolismo anaeróbico, o oxigênio também é necessário em um primeiro momento como fator de crescimento para a biossíntese das membranas constituídas de ácidos graxos e esteróis. Assim como macronutrientes como enxofre, aminoácidos, fósforo, potássio e magnésio e micronutrientes como cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco. Geralmente, *S. cerevisiae* requerem baixas concentrações de fatores de crescimento como vitaminas (biotina), pirimidinas, purinas, nucleotídeos, nucleosídeos, aminoácidos, esteróis e ácidos graxos (45). O teor de etanol encontrado nas cervejas ao final do processo de fermentação pode ser observado na Tabela 9. A fermentação foi considerada encerrada quando as amostras apresentaram valores constantes de SST por pelo menos três dias consecutivos.

**Tabela 9.** Teor de etanol (% v/v) ao final do processo fermentativo de amostras de cervejas produzidas com fermentação mista de cepas (P4+CR1, P4+LC2-1, P4+TSF) e controle (Pilsen e P4).

	<i>Etanol (% v/v)</i>
<b>Pilsen</b>	2,78 <sup>a</sup> ± 0,03
<b>P4</b>	2,99 <sup>b</sup> ± 0,17
<b>P4+CR1</b>	3,02 <sup>c</sup> ± 0,04
<b>P4+LC2-1</b>	2,88 <sup>b</sup> ± 0,05
<b>P4+TSF</b>	2,88 <sup>b</sup> ± 0,02

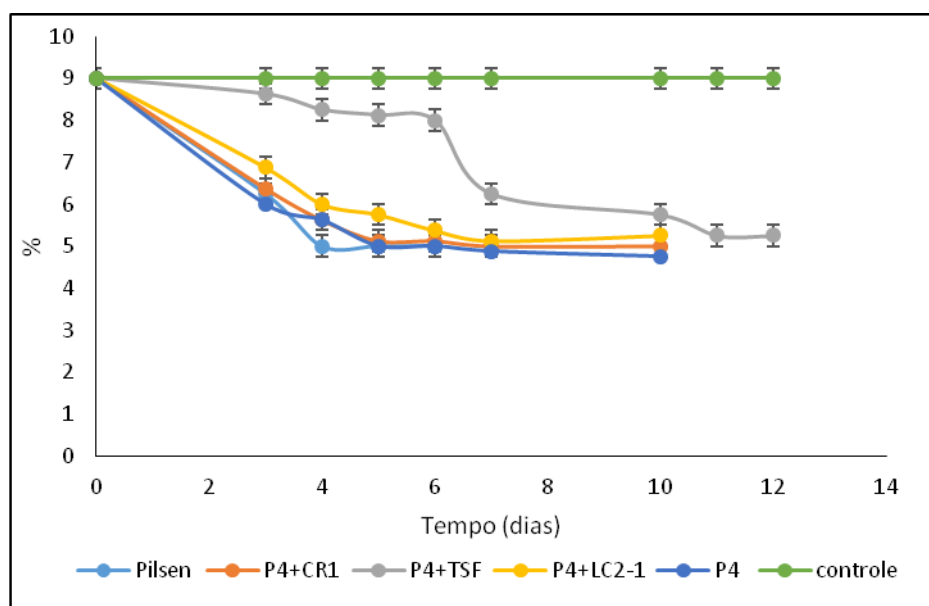
<sup>a,b</sup> Médias com letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Pilsen: *starter* Pilsen (*lager*), P4: *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* (CR1), *Torulaspora delbrueckii* (LC2-1), *Candida zemplinina* (TSF).

Foi observada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os teores de etanol das cervejas produzidas com as cepas *starter* 'Pilsen' e fermentação mista P4+CR1 (Tabela 8). A cepa *starter* 'Pilsen' apresentou os teores mais baixos de etanol, enquanto a fermentação realizada com a P4+CR1, níveis mais altos. Após uma simulação de refermentação em garrafa com adição de *primer*, procedimento largamente empregado em cervejas artesanais, o teor alcoólico atingiu valores na faixa de 3,4 a 3,8 % (v/v). Na refermentação, a levedura pode produzir compostos de aroma que serão benéficos sensorialmente, porém, neste caso a produção de etanol pode ser um inconveniente. Entre os grupos com teores alcoólicos mais altos destacaram-se P4 e P4+CR1,  $3,83 \pm 0,05$  % e  $3,85 \pm 0,04$  %, respectivamente. Por outro lado, a cepa P4, quando combinado a TSF ou LC2-1, levou a uma produção de etanol um pouco mais baixa,  $3,53 \pm 0,03$  % e  $3,47 \pm 0,04$  %, respectivamente. Vale ressaltar que em função dos teores de etanol observados (Tabela 8), todas as fermentações testadas com ou sem refermentação, poderiam ser consideradas para a produção de cervejas com baixo teor alcoólico ( $< 4,0$  % v/v), especialmente se considerarmos os teores de etanol antes da refermentação. No entanto, verifica-se que é possível produzir cerveja artesanal sem a refermentação como a cerveja isotônica de baixo teor alcoólico produzida na primeira parte deste trabalho que conseguiu obter notas satisfatórias em análise sensorial para aceitação do produto.

Em relação ao processo fermentativo, para a cepa *starter* Pilsen, este foi de 6 dias, enquanto que para as cepas P4, P4+CR1, P4+LC2-1 a fermentação se prolongou por 10 dias. Por outro lado, o grupo P4+TSF apresentou consumo mais lento de açúcares do mosto e portanto a fermentação foi encerrada somente no 12º dia (Figura 27). O mosto apresentou um SST inicial de 9 %, chegando à faixa de 5 % para todas as cepas avaliadas entre 6 a 12 dias. Em trabalho com produção de cerveja até 0,5 % (v/v) de etanol com levedura não-convencional *Saccharomyces ludwigi* (99), a fermentação foi conduzida por 15 dias. Portanto, verifica-se variação de tempo para cada cepa quanto ao decréscimo do SST durante a fermentação.

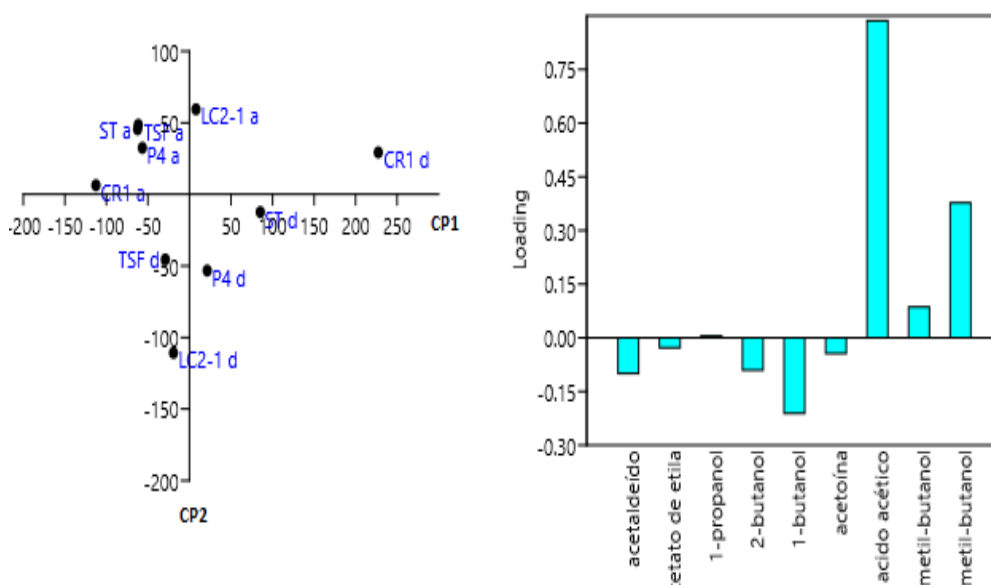
**Figura 27.** Evolução de sólidos solúveis totais (SST %) de 5 fermentações (Pilsen, P4+CR1, P4+TSF, P4+LC2-1, P4 e controle constituído somente de malte sem adição de cepas) em pequena escala (100 mL), em mosto cervejeiro Pilsen por 6 dias (cepa Pilsen), 10 dias (cepas P4, P4+CR1, P4+LC2-1) e 12 dias (cepa P4+TSF). Barras verticais indicam o desvio padrão da média (n=3).



Foram produzidas cervejas com *C. zemplinina* (Y.01670) em escala de laboratório (300 mL) com mosto inicial de SST 12 %, pH 4,8 e 18°C por 8 dias (99). O teor alcoólico obtido foi de 1,5 % (v/v) e após refermentação, o teor final foi de 1,7 % (v/v). Já *T. delbrueckii* quando avaliada em mostos puro malte (SST 12,2 %, pH 5,3), apresentou teor alcoólico de 2,34 % (v/v) (100). Enquanto *Z. bailii*, em trabalho conduzido em mosto 6,6 % SST, obteve teor alcoólico de 0,42 % (v/v) em 4 dias de fermentação a 25°C (101).

Com o intuito de se verificar eventuais similaridades e diferenças entre os grupos de fermentação, os dados relativos aos teores de metabólitos secundários foram submetidos à análise de componentes principais (ACP), e foram avaliadas nesta análise as concentrações de acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol, 2-butanol, 1-butanol, acetoína, ácido acético, 2-metil-butanol e 3-metil-butanol, antes e após a refermentação em garrafa (Figura 28).

**Figura 28.** Análise de componentes principais dos compostos secundários (acetaldeído, acetato de etila, 1-propanol, 2-butanol, 1-butanol, acetoína, ácido acético, 2-metil-butanol e 3-metil-butanol) antes (a) e depois (d) da refermentação em garrafa. Dados obtidos pela média (n=3) de cada um dos cinco grupos de fermentação [Starter Pilsen (ST), P4, P4+CR1 (CR1), P4+LC2-1 (LC2-1), P4+TSF (TSF)].



A soma de componentes principais (CP) foi de 94,72%, o que indica que a variabilidade entre os grupos foi quase que totalmente explicada somente por estes dois componentes (CP1 e CP2). O componente principal 1 (CP1) foi representado pelo eixo X e o componente 2 (CP2), pelo eixo Y. A maioria dos grupos antes da refermentação concentraram-se no quadrante 2, enquanto os grupos após a refermentação, no quadrante 1 (P4+CR1), quadrante 3 (P4+LC2-1 e P4+TSF) e quadrante 4 (Pilsen e P4). Os grupos que sofreram maior influência da CP1 foram P4+CR1 e Pilsen, ambos após a refermentação. Visto que a CP1 é influenciada pela variação de ácido acético produzido nos diversos grupos, verificam-se que estes foram os que obtiveram maiores teores

deste composto secundário, o que não é desejável pois quando este apresenta-se acima do limiar sensorial de 130 mg.L<sup>-1</sup>, pode conferir sabor desagradável à cerveja. Neste caso, foram encontrados valores de 398 mg.L<sup>-1</sup> para o grupo Pilsen e 504 mg.L<sup>-1</sup> para o grupo P4+CR1. Contudo, outras cervejas são relatadas na literatura contendo mais de 800 mg.L<sup>-1</sup>, tanto para produções com cepas *Saccharomyces* quanto para as não *Saccharomyces* (102).

Outros compostos que sofrem influência da CP1 foram o 2-metil-butanol e 3-metil-butanol. Estes são substratos para compor o sabor da cerveja a partir da via de aminoácidos como a leucina e possuem limiar organoléptico de 65 mg.L<sup>-1</sup>, ou seja, valores superiores poderiam conferir um sabor alcoólico ou de solvente à cerveja (103).

O CP2 foi influenciado principalmente pelos álcoois 1-butanol e 2-butanol. Outros álcoois superiores comumente encontrados em bebidas fermentadas incluem: 1-propanol, 3-metil-1-butanol, juntamente com mais de 40 outros. A regulação da biossíntese de álcoois superiores é complexa, uma vez que estes compostos podem ter sido produzidos como subprodutos do metabolismo de aminoácidos ou via piruvato e etanol a partir do metabolismo de carboidratos. Em cervejas de baixa fermentação como a Pilsen, podem constituir um *off-flavor* porém podem apresentar-se em maiores concentrações em cervejas de alta fermentação (*ale*) (104). O grupo P4+LC2-1 pareceu sofrer influência principalmente do CP2 e os teores de ambos os álcoois diminuíram após a refermentação. Antes da refermentação, o teor de 2-butanol era de 102,5 mg.L<sup>-1</sup> e diminuiu para 13,22 mg.L<sup>-1</sup> após a refermentação. O mesmo comportamento ocorreu com 1-butanol para este mesmo grupo, antes da refermentação o teor era de 173,2 mg.L<sup>-1</sup> e após 44,6 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, tendo em vista que o limiar sensorial para estes compostos deve ser superior a 300 mg.L<sup>-1</sup> (105), nenhum grupo antes ou após a fermentação atingiu limites superiores a 200 mg.L<sup>-1</sup>, o que é benéfico, pois poderia conferir um possível sabor identificado como “solvente” ao produto final. Enquanto os outros grupos pareceram sofrer menos alterações com relação a estes dois compostos, o grupo P4+LC2-1, apresentou maior distância entre as amostras antes e depois da refermentação no eixo Y. A refermentação trouxe alterações gerais aos nove compostos avaliados em todos os grupos. Antes da refermentação as

amostras eram mais similares entre elas, pois todas ficaram dispostas no mesmo quadrante (Figura 28). Assim, após a refermentação, ocorreram alterações bioquímicas evidenciadas pela dispersão das amostras nos demais quadrantes.

Na ausência de oxigênio, tal como ocorre na produção de cerveja, o acetil-CoA pode ser esterificado enzimaticamente com um álcool para formar ésteres de acetato. Também os etil ésteres são derivados de ácidos graxos de cadeia média e formados a partir de cadeias mais longas de acil-CoA com etanol. Outro fato que interfere na produção de ésteres é a condição do mosto. Já que mostos turvos podem adsorver ácidos graxos insaturados induzindo a síntese de ésteres (103). O acetato de etila, comumente encontrado em bebidas fermentadas, possui limiar sensorial de  $3,9 \text{ mg.L}^{-1}$  e apresenta notas frutadas e de solvente. Neste caso, foi encontrado em concentrações cinco a seis vezes superiores em todos os grupos antes da refermentação. No entanto, após a refermentação, esses valores diminuíram, porém ainda eram de 3 a 4 vezes superiores ao limiar sensorial. Ainda assim, tanto antes ou após a refermentação, os valores encontravam-se dentro do esperado (106).

Já o acetaldeído é o carbonil presente na cerveja, produzido pelas leveduras como resultado da descarboxilação do piruvato e é um intermediário na formação metabólica do etanol durante a glicólise. Pode estar presente na cerveja em concentrações acima de seu limiar de sabor (aproximadamente  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ ), e confere um caráter indesejável de grama cortada ou maçã verde. No grupos avaliados foram encontrados valores superiores a  $40 \text{ mg.L}^{-1}$  antes da refermentação, sendo que o grupo com menor teor deste composto foi P4+TSF, que após a refermentação apresentou  $21,4 \text{ mg.L}^{-1}$  de acetaldeído. Este resultado indica que a refermentação pode ser vantajosa, visto que altos teores deste composto podem impactar negativamente na análise sensorial da cerveja. Este carbonil acumula-se durante o período de crescimento ativo. Tal como acontece com os álcoois e ésteres superiores, a extensão da acumulação de acetaldeído é determinada pela cepa empregada e pelas condições de fermentação. Embora a cepa de levedura seja de importância primordial, a concentração elevada de oxigênio no mosto, a taxa de inoculação, a gravidade do mosto e a fermentação influenciam o acúmulo de acetaldeído (107). O acetaldeído é conhecido há muito tempo como um produto da

fermentação alcoólica pela levedura. A concentração de acetaldeído em vários mostos de vinho, após fermentações com duração de 5 a 15 dias, variou de 20 a 200 mg.L<sup>-1</sup> no meio fermentado. Em um estudo sobre a produção de acetaldeído por leveduras *S. cerevisiae* com 86 cepas em mosto sintético e em mosto de uva (108), a produção de acetaldeído não diferiu significativamente entre os dois meios (~60 mg.L<sup>-1</sup>), sendo o resultado inerente à cada cepa. No entanto, foi relatado que temperatura de fermentação de 30°C pode aumentar a produção de acetaldeído. As cepas foram classificadas em três diferentes fenótipos, ou seja, de baixa, média e alta produção de acetaldeído em *S. cerevisiae*. Os fenótipos de baixa e alta também diferiram consideravelmente na produção de ácido acético, acetoína e álcoois superiores e podem ser úteis para o estudo da produção de acetaldeído em *S. cerevisiae* (108). O metabolismo do acetaldeído, etanol e acetato em *S. cerevisiae* envolve as duas enzimas responsáveis por suas vias metabólicas: álcool desidrogenase (ADH) e a aldeído desidrogenase (ALDH). O metabolismo entre o etanol e o acetaldeído é catalisado pela ALDH (103). Além disso, o acetaldeído pode ser metabolizado por oxidação em acetato, com aldeído desidrogenases (ALDH). A presença de acetaldeído é uma das muitas condições de estresse que as células de levedura podem encontrar. Vários genes de proteínas de choque térmico (HSP) são induzidos e também estão envolvidos na resposta a outras formas de estresse (por exemplo, etanol). ALDHs desempenham um papel importante durante o metabolismo de acetaldeído de levedura quando as células estão crescendo em etanol. A adição intencional de acetaldeído (ou etanol) a leveduras de vinho induz a expressão de alguns genes ALD, consequentemente aumenta a atividade da ALDH (103).

Por fim, pode-se dizer que os grupos foram separados principalmente com relação a refermentação. Ou seja, significa que após um mês a cerveja “verde”, adquiriu um perfil diferenciado de metabólitos secundários que impactaram no sensorial do produto final. Apesar de não ter sido verificada uma diferença significativa entre os grupos com diferentes cepas para os compostos secundários avaliados, verificam-se que em outros trabalhos com leveduras não-*Saccharomyces* (98), também acarretou em um perfil semelhante de metabólitos secundários, incluindo acetaldeído e acetato de

etila quando a comparação foi realizada entre cervejas de até 0,5% (v/v) de etanol e cervejas Pilsen.

No entanto, outros fatores como baixa produção de etanol e facilidade de manuseio de determinadas cepas, poderiam colaborar para a eleição de um grupo de leveduras adequadas à produção de cervejas de baixo teor alcoólico. Também a utilização de ferramentas como a análise sensorial e execução da fermentação com os mesmos grupos de cepas porém em outros tipos de mosto, impactam em diferenças no perfil de metabólitos secundários e consequentemente a obtem-se um novo produto final (dados não publicados).

## 8 CONCLUSÃO

Foi possível produzir cervejas de baixo teor alcoólico utilizando-se métodos de abordagem biológica. Foram utilizados os mesmos equipamentos tradicionalmente utilizados para a produção da cerveja convencional. Mais especificamente, foram abordadas as modificações das condições de mosturação, assim como limitação da fermentação e utilização de leveduras não convencionais.

As cervejas de baixo teor alcoólico isotônica desenvolvida e de marca alemã são produtos diferentes das bebidas isotônicas em relação aos parâmetro físico-químicos, porém, apresentaram características mais próximas às bebidas isotônicas que a cerveja convencional puro malte e cervejas do tipo 0,0 % de álcool comercializadas no Brasil. Além disso, todas as cervejas apresentam compostos fenólicos que apresentam propriedades antioxidantes e benefícios à saúde. Esses benefícios estariam ausentes nas bebidas isotônicas visto que estas se destinam exclusivamente a hidratação e não possuem compostos fenólicos em sua composição.

Também ficou claro que a maioria dos julgadores ao avaliar uma cerveja sem álcool, tem em mente a cerveja 'Pilsen' como padrão para avaliação. Portanto, verifica-se um mercado em expansão que pode ser explorado ofertando-se produtos que apresentem não só teor alcoólico mais baixo, como também sensorial mais agradável ou mais próximo ao da cerveja 'Pilsen'. A adição de sais à cerveja desenvolvida não influenciou a aceitabilidade deste produto em relação às demais cervejas avaliadas sensorialmente.

Com relação às leveduras não *Saccharomyces*, verificam-se que estas apresentam-se como uma alternativa a serem empregadas em fermentações mistas com leveduras *Saccharomyces* ou em outros desenhos experimentais, por exemplo em fermentações puras, uma vez que possibilitam a oferta de novos produtos ao mercado. Visto que tenham sido mais exploradas no campo de vinhos, mais estudos em mostos cervejeiros são necessários antes de sua aplicação tecnológica em larga escala.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

(1) Brasil. Casa Civil. Decreto n. 9.902 de 8 de julho de 2019. Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 08 jul.2019.

(2) Cervbrasil. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Anuário 2016. [cited 2018 Mar 07]. Available from: [http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2016\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2016_WEB.pdf).

(3) Bellut K, Arendt EK. Chance and Challenge: Non-Saccharomyces yeasts in non-alcoholic and low alcohol beer brewing – A review. Journal of the American Soc of Brew Chem. 2019; 77 (2):77-91.

(4) Liguori L, et al. Production of low-alcohol beverages: current status and perspectives. In: Food Processing for Increased Quality and Consumption. Grumezescu, AM, Holban AM (editors). 2018; p.347–382. Cambridge (USA): Academic Press.

(5) Superior Tribunal de Justiça. Cervejas com graduação alcoólica de até 0.5% não podem usar expressão “sem álcool”; 2016. [cited 29 jan 2019]. Available from: [http://www.stj.jus.br/sites/STJ/default/pt\\_BR/Comunica%C3%A7%C3%A3o/noticias/Not%C3%ADcia\\_s/Cervejas-com-gradua%C3%A7%C3%A3o-alco%C3%B3lica-de-at%C3%A9-0,5%25-n%C3%A3o-podem-usar-express%C3%A3o-%E2%80%9Csem-%C3%A1cool%E2%80%9D](http://www.stj.jus.br/sites/STJ/default/pt_BR/Comunica%C3%A7%C3%A3o/noticias/Not%C3%ADcia_s/Cervejas-com-gradua%C3%A7%C3%A3o-alco%C3%B3lica-de-at%C3%A9-0,5%25-n%C3%A3o-podem-usar-express%C3%A3o-%E2%80%9Csem-%C3%A1cool%E2%80%9D).

(6) Russell I, Kellershohn J. Advances in Technology and New Product Development in the Beer, Wine, and Spirit Industry. In Innovations in Technologies for Fermented Food and Beverage Industries. 2018; Cham: Springer.

- (7) Brouns F, Kovacs E. Functional drinks for athletes. *Trends Food Sci Tech.* 1997; 8: 414–421.
- (8) Maughan RJ. The sports drink as a functional food: Formulations for successful performance. *Proc Nutr Soc.* 1998; 57:15–23.
- (9) Scientific Committee on Food. Report on Composition and Specification of Food Intended to Meet the Expenditure of Intense Muscular Effort, Especially for Sportsmen. SCF/CS/NUT/SPORT/5, 2001. [cited 2015 out 15]. Available from: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/+out64\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/+out64_en.pdf).
- (10) Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 18 de 27 de abril de 2010. Dispõe sobre alimentos para atletas. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 27 abr.2010.
- (11) Gisolfi CV, Duchman SM. Guidelines for optimal replacement beverages for different athletic events. *Medicine and Science in Sports and Exercise.* 1992; 24 (6).
- (12) Sawaka MN, Montain SJ. Fluid electrolyte supplementation for exercise heat stress. *American Journal Clinical Nutrition.* 2002; 72.
- (13) Marins JCB, Dantas EHM, Navarro SZ. Parâmetros subjetivos durante o esforço contínuo e grau de interferência de quatro procedimentos diferenciados de hidratação. 2001; In: 5º Congresso Paulista de Educação Física.
- (14) Gironés-Vilaplana, et al. Evaluation of sensorial, phytochemical and biological properties of new isotonic beverages enriched with lemon and berries during shelf-life. *J. Sci. Food Agric.* 2013; 94:1090-1100.
- (15) Meussdoerffer FA comprehensive history of beer brewing. In: Eßlinger H M (Org). *Handbook of Brewing: process, technology, markets.* 2009; Weinheim: Verlag GmbH & Co.

(16) Clair B, Keh A. German Olympians Drink a Lot of (Non-alcoholic) Beer, and Win a Lot of Gold Medals. *The New York Times*; 2018. [cited 2018 Mar 01]. Available from: <https://www.nytimes.com/2018/02/19/sports/olympics/germany-olympics-beer.html>.

(17) Scherr S, et al. Non-Alcoholic Beer Reduces Inflammation and Incidence of Respiratory Tract Illness. *Med & Sci in Sports & Exercise*. 2011.

(18) American College of Sports Medicine. American College of Sports Medicine Position Stand. Exercise and fluid replacement. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2007; 39 (2):377–390.

(19) Ebert TR, et al. Influence of hydration status on thermoregulation and cycling hill climbing. *Med and Sci in Sports and Exercise*. 2007; 39 (2):323–329.

(20) Devlin LH, et al. Moderate levels of hypohydration impairs bowling accuracy but not velocity in skilled cricket players. *Journal of Sci and Med in Sport*. 2001; 4 (2):179–187.

(21) Tomporowski P D, et al. Effects of dehydration and fluid ingestion on cognition. *Int Journal of Sports Med*. 2007; 28: 891–896.

(22) Armstrong L, Costill D, Fink W. Influence of diuretic-induced dehydration on competitive running performance. *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 1985; 17 (4):456–461.

(23) Moquin A, Mazzeo RS. Effect of mild dehydration on the lactate threshold in women. *Med and Sci in Sports and Exercise*. 2000; 32 (2): 396–402.

(24) Mitchell JB, et al. Postexercise rehydration: effect of Na<sup>+</sup> and volume on restoration of fluid spaces and cardiovascular function. *Journal of Applied Phys*. 2000; 89:1302–1309.

(25) Maughan RJ, Leiper JB. Sodium intake and post-exercise rehydration in man. *Europ Journal of Applied Phys*, 1995; 71: 311–319.

(26) Shirreffs SM, et al. Post-exercise rehydration in man: effects of volume consumed and drink sodium content. *Med and Sci in Sports and Exercise*. 1996; 28 (10): 1260–1271, 1996.

(27) Burke LM, Read RS. A study of dietary patterns of elite Australian football players. *Canadian Journal of Sport Sciences*. 1988; 13 (1):15–19.

(28) Dietze PM, Fitzgerald JL, Jenkinson, R.A. Drinking by professional Australian Football League (AFL) players: prevalence and correlates of risk. *Med Journal of Australia*. 2008; 189 (9): 479–483.

(29) Eggleton MG. The diuretic action of alcohol in man. *Journal of Phys*. 1942; 101:172–191.

(30) Desbrow B, Murray D, Leveritt M. Beer as a Sports Drink? Manipulating Beer's Ingredients to Replace Lost Fluid. *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*. 2013; 23:593 -600.

(31) Shirreffs SM, Maughan RJ. Restoration of fluid balance after exercise-induced dehydration: effects of alcohol consumption. *Journal of Applied Physiology*. 1997; 83 (4):1152–1158.

(32) Hobson RM, Maughan RJ. Hydration status and the diuretic action of a small dose of alcohol. *Alcohol and Alcoholism*. Oxford: Oxfordshire. 2010; 45(4):366–373.

(33) Minehan MR, Riley MD, Burke L M. Effect of flavor and awareness of kilojoule content of drinks on preference and fluid balance in team sports. *International Journal of Sport Nutrition Exercise Metabolism*. 2002; 12(1):81-92.

(34) Wald N Leshem M. Salt conditions a flavor preference or aversion after exercise depending on NaCl dose and sweat loss. *Appetite*. 40 (3):277-284.

(35) Coso J del, Estevez E, Baquero R A, Mora-rodriguez R. Anaerobic performance when rehydrating with water or commercially available sports drinks during prolonged exercise in the heat. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*. 2008; 33 (2), p. 290-298.

(36) Armstrong LE. *Performing in extreme environments*. Champaign: Human Kinetics; 2000.

(37) Bergeron MF. Sódio: o nutriente esquecido. *Sports Science Exchange*; 2001, 13 (3). [cited 2017 jan 30]. Available from: <http://www.gssi.com.br/artigo/59/sse-29-sodio-o-nutriente-esquecido>.

(38) Srebernich SM. Caracterização física e química da água de fruto de coco (*cocos nucífera*), variedades gigante e híbrido pb-121, visando o desenvolvimento de uma bebida com características próximas às da água de coco. Tese [Doutorado em Tecnologia de Alimentos]. Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998, 189f.

(39) Wolinski I, Hickson Junior JF. *Nutrição no exercício e no esporte*. 2<sup>nd</sup> ed. São Paulo: Roca; 1996.

(40) Kenney WL. Requerimentos nutricionais de água e sódio para adultos ativos. *Sports Sci Exch*. 2004; 17(1).

(41) Schneider C, et al. Ethanol Concentration In Breastmilk After The Consumption Of Non-Alcoholic Beer. *Breastfeed Med*. 2013; 8: 291-293.

(42) Aguilar MTH. Estudio de la suplementación de la dieta materna con cerveza sin alcohol, su efecto sobre las propiedades antioxidantes de la leche humana y el metabolismo oxidativo infantil. [Tese]. Valencia: Facultad de Medicina, Departamento de Pediatría y Obstetricia; 2015.

- (43) Branyik T, et al. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer. Production. Journal of Food Eng. 2011; 108 (4): 496-503.
- (44) Capece A, et al. Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. Fermentation. 2018; 4 (38).
- (45) Budroni M, et al. *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* starter yeast. In Brewing Technology; Kanauchi, M, Ed. Rijeka: Intech; 2017: 81–100.
- (46) Aguilar-Uscanga MG, Délia ML, Strehaiano P. *Brettanomyces bruxellensis*: Effect of oxygen on growth and acetic acid production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003; 61:157–162.
- (47) Marongiu A, et al. Novel starters for old processes: Use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. Ind Microbiol Biotechnol. 2015; 42: 85–92, 2015.
- (48) Sohrabvandi S, et al. Alcohol-free beer: Methods of production, sensorial defects and healthful effects. Foods rev Int. 2010; 26 (4):335-352.
- (49) Instituto Adolfo Lutz. Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: IMESP; 2008.
- (50) Tarancon JLL, Lachenmeier DW. Determination of Osmolality in Beer to Validate Claims of Isotonicity. Beverages. 2015; 1:45-54.
- (51) European Brewery Convention. Section 9 Beer Method, 9.6 Beer Colour of Beer. Spectrophotometric method, Instrumental method. Analytica. Numburg: Verlag Hans Carl Getranke Fachverlag; 2004.
- (52) Brasil. Casa Civil. Decreto n. 6.871 de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei n. 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 4 jun. 2009.

- (53) Oliver G. The Oxford Companion to Beer. Oxford: Oxford University Press; 2012.
- (54) Silva PHA, Faria FC. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. Cienc Tecnol Aliment. 2008; 28 (4):902-906.
- (55) Geisler J, Weiß N. Beer Bitterness Analysis Protocol using an Eppendorf BioSpectrometer. Short Protocol. 2015; 6.
- (56) Brasil. Ministério da Agricultura. Portaria n. 76 de 26 de novembro de 1986. Dispõe sobre os métodos analíticos de bebidas e vinagre. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 26 nov.1986.
- (57) Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic- phosphotungstic acid reagent. American Journal of Enology and Viticulture, 1965; 16:44 – 158.
- (58) Zhao H, Chen W, Lu J, Zhao M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. Food Chem. 2010; 19 (3):1150-1158.
- (59) Okumura F, Cavalheiro ETG, Nobrega JA. Experimentos simples usando fotometria de chama para ensino de princípios de espectrometria atômica em cursos de química analítica. Quím. Nova [online]. 2004; 27 (5): 832-836.
- (60) American Public Health Association. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3<sup>rd</sup> ed. Washington: American Public Health Association; 1992.
- (61) Sami A, Ikeda M, Yabuuchi AS. Evaluation of the alkaline methylene blue staining method for yeast activity determination. Journal of Ferm and Bioeng. 1994; 78.

(62) Meilgaard M, Civille GV, Carr G. Sensory Evaluation Techniques. 3<sup>rd</sup> ed. London: CRC; 1999.

(63) Furlani MVM, et al. Selection of non-Saccharomyces yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. Fems Yasts Research. 2017; 17.

(64) Romano P, et al. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value added. International Journal of Food Microbiology. 2018 (284): 22–30.

(65) Ness F, et al. Identification of yeast strains using the polymerase chain reaction. J. Sci. Food Agriculture. 1993; 62: 89-94, 1993.

(66) Legras J, Karst F. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterization. Fems Microbiol Lett. 2003; (221): 249-255.

(67) Macwilliam IC. pH in malting and brewing a review. J. Inst. Brew. 1975 81:65-70.

(68) He Y, et al. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer a review. J. Inst. Brew. 2014; 120:157-163.

(69) Coote N, Kirsop BH. The content of some organic acids in beer and other fermented media. J. Inst. Brew. 1974; 80.

(70) Boulton C, Quain D. Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science: United Kingdom; 2001.

(71) Pelczar M, Reid R, Chan ECS. Microbiologia. São Paulo: McGraw-Hill; 1980, 1.

(72) Whiting GC. Organic acid metabolic of yeasts during fermentation of alcohol beverages a review. J Inst Brew. 1976; 82:84-92.

(73) Pandey A, et al. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages. Amsterdam: Elsevier; 2017.

(74) Preedy VR. Processing and Impact on Active Components in Food. San Diego: Elsevier; 2015.

(75) Arranz S, et al. Wine, beer, alcohol and polyphenols on cardiovascular disease and cancer. 2012; 7:759-81.

(76) Zhao H. Effects of Processing Stages on the Profile of Phenolic Compounds in Beer. In book: Processing and Impact on Active Components in Food; 2015.

(77) Luarasi L, Troja R, Pinguli L. Yeast vitality monitoring during the fermentation process of beer production. J. Hyg Eng and Des. 2017; 19:78-81.

(78) Bleoanca I, Brahrin G. Overview on Brewing Yeast Stress Factors. Romanian Biotech Letters. 2013; 18 (5).

(79) Haffmans. Manual de Instruções redpost monitor de pasteurização. [cited 2018 Mar 09]. Available from:  
[www.vipbeverages.com.br/criativos/1300/a10s0001/070226/0012a.doc](http://www.vipbeverages.com.br/criativos/1300/a10s0001/070226/0012a.doc).

(80) Brasil. Ministério da Saúde Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 02 jan.2001.

(81) Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 54, de 5 de novembro de 2001. Estabelece a identidade e

qualidade dos produtos de cervejaria destinados ao consumo humano. Diário Oficial [da] República federativa do Brasil, Brasília, 6 nov. 2001.

(82) Back W. Colour atlas and handbook of beverage biology. Nurnberg: Fachverlag Hans Carl; 2005.

(83) Markovic K. Application of electronic tongue in isotonic sports drinks characterization and differentiation during storage. Croat J Food Sci Technol. 2011; 3 (2):32-38.

(84) Campbell BI, Spano MA. NSCA's Guide to Sport and Exercise Nutrition. USA: Human Kinetics; 2011.

(85) Mettler S, Rusch C, Colombani PC. Osmolality and pH of sport and other drinks available in Switzerland. Schweizerische Zeitschrift für Sportmedizin und Sporttraumatologie. 2006; 54 (3): 92–95.

(86) Vist GE, Maughan RJ. The effect of osmolality and carbohydrate content on the rate of gastric emptying of liquids in man. J. Physiol. 1995; 486: 523–531.

(87) Leiper JB. Intestinal water absorption – implications for the formulation of rehydration solutions. Int J Sports Med. 1998; 19:129–132.

(88) Morton DP, Aragon-Vargas LF, Callister R. Effect of ingested fluid composition on exercise-related transient abdominal pain. Int J Sport Nutr Exerc Metab. 2004; 14:197–208.

(89) Appleton KM. Changes in the perceived pleasantness of fluids before and after fluid loss through exercise: a demonstration of the association between perceived pleasantness and physiological usefulness in everyday life. Physiol. Behav. 2005; 83:813–819.

(90) International Union of pure and applied chemistry. [cited 2019 Mar 23]. Available from: <https://iupac.org/>.

(91) De Keukeleire D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quím. Nova*. 2000; 23 (1):108-112.

(92) Moura-Nunes N, et al. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. *Food Chem*. 199:105–113.

(93) Kunze W. Technology malting and brewing. Germany: VLB; 1996.

(94) Parcunev I, et al. Modelling of Alcohol Fermentation in Brewing Some Practical Approaches. Plovdiv: University of Food Technology. 2012; 7.

(95) Krennhuber K, Kahr H, Jäger A. Suitability of Beer As An Alternative to Classical Fitness Drinks. *Current Research in Nutrition and Food Science*. 2016; 4:26-31.

(96) Aucott JN, et al., *Rev Infect Dis*. 1990; 440 (12): 406-411.

(97) Hazen KC, *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8:462-478.

(98) Jiang Z, et al. A novel approach for the production of a non-alcohol beer (<0.5% abv) by a combination of limited fermentation and vacuum distillation *J Inst Brew*. 2017; 123: 533-536.

(99) Estela-Escalante WD, et al. Evaluation of the Fermentative Potential of *Candida zemplinina* Yeasts for Craft Beer Fermentation. *Inst Brew*. 2016; 122: 530–535.

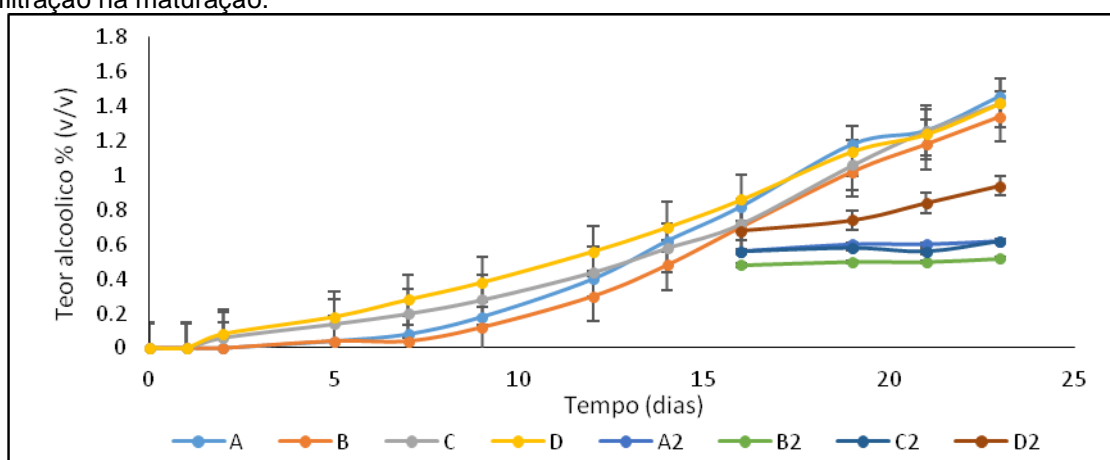
- (100) Tataridis P, et al. Differentiating Beer Aroma, Flavor and Alcohol Content through the Use of *Torulasporea delbrueckii*. [cited 2016, Sep 12]. Young Scientists Symposium for Brewing, Malting and Distilling, Chico, USA.
- (101) Bellut K, et al. Application of Non-*Saccharomyces* Yeasts Isolated from Kombucha in the Production of Alcohol-Free Beer. *Fermentation*. 2018; 4.
- (102) Liu SQ, Quek YH. Beer Fermented with *Williopsis* Yeast. *Food Technol Biotechnol*. 2016; 54 (4): 403-412.
- (103) Stewart GG. The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Ferm*. 2017 3 (63).
- (104) Hazelwood LA, et al. The Ehrlich Pathway for fusel oil production: A century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol*. 2008, 74:2259–2266.
- (105) Olaniran AO, et al. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Inst of Brew*. 2017; 23 (1).
- (106) Kleinová J, Geršl M, Mareček J. Monitoring Volatile Substances in Beer in Relation to Beer Production Technology. *Advanced Agric Technol*. 2015; 2 (2).
- (107) Saerens SM. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. 80: 1039–1051.
- (108) Romano P, et al. Acetaldehyde production in *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Fems Microb Letters*. 1994; 118 (3).
- (109) Ncps Board. *Manufacture of Food and Beverages*. 2<sup>nd</sup> ed. Delhi: NIIR Project Consultancy Services; 2012.

## ANEXOS

### ANEXO I: Desenvolvimento da cerveja de baixo teor alcoólico– lotes piloto

A evolução do teor de etanol (%) durante a fermentação e maturação dos diferentes grupos de cervejas produzidas pode ser observado na Figura 29.

**Figura 29.** Evolução do teor de etanol (%) nos oito grupos avaliados ao longo de 23 dias a partir de uma produção-mãe. A – Fermentação em 2 dias com adição de sais de sódio e potássio no mosto antes da fermentação, B – Fermentação em 2 dias sem adição de sais, C – Fermentação em 3 dias com adição de sais, D – Fermentação em 3 dias e sem adição de de sais; A2 - Grupo A submetido à filtração na maturação; B2 – Grupo B submetido à filtração na maturação; C2 – Grupo C submetido à filtração na maturação; D – Grupo D submetido à filtração na maturação.



Durante o processo de fermentação e maturação dos lotes sem a remoção de levedura, foi observado aumento contínuo no teor alcoólico que atingiu 1,4 % aos 23 dias (Figura 2). Neste caso, não houve diferença significativa entre as amostras destes lotes ( $p > 0,05$ ). A adição de sais ou o tempo de fermentação não foi capaz de modificar os teores de etanol das amostras destes lotes ( $p > 0,05$ ). Por outro lado, as cervejas que foram filtradas antes da maturação, com ou sem adição de sais, e independentemente do tempo de fermentação, apresentaram teores significativamente inferiores de etanol ( $p < 0,05$ ) (Figura 29). Desta forma, verificou-se a importância de submeter a produção de cerveja de baixo teor alcoólico a um processo de filtração e/ou centrifugação. Esta última operação unitária apresenta vantagens em relação à primeira, pois apresenta-se como um sistema fechado, evitando a contaminação e proporcionando melhor rendimento final. Similarmente, ambas operações visam remover a população remanescente de leveduras e evitam que o teor de etanol continue subindo durante a etapa de maturação (109).

## ANEXO II

**TCLE -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Eu \_\_\_\_\_, RG \_\_\_\_\_,  
Estado Civil \_\_\_\_\_, Idade \_\_\_\_\_ anos, Residente na  
nº \_\_\_\_\_, Bairro \_\_\_\_\_, Cidade \_\_\_\_\_, Telefone

**Declaro ter sido esclarecido sobre os seguintes pontos:**

1. O trabalho tem por finalidade avaliar a aceitabilidade de uma nova cerveja de baixo teor alcoólico que foi produzida na instalação cervejeira da Fatec Jaboticabal e mais duas amostras de cerveja tipo 0,0% comerciais;
2. Ao participar desse trabalho contribuirei para a melhoria da qualidade do produto final produzido;
3. **Pessoas que apresentem intolerância ao glúten ou alergia a qualquer ingrediente (malte de cevada, levedura ou lúpulo) não poderão participar da análise sensorial desta bebida.**
4. Como voluntário deste estudo, declaro ter mais de 18 anos de idade e participarei do teste de aceitação das bebidas e informarei o quanto gostei ou desgostei do produto, utilizando uma ficha apropriada.
5. Para a realização da análise sensorial não será necessária a ingestão da quantidade total de bebida apresentada (aproximadamente 30mL).
6. Precisaréi comparecer ao laboratório de análise sensorial da FCF para a realização do teste de aceitação do produto;
7. A minha participação como voluntário na análise sensorial do produto terá duração de um dia (sessão única);
8. Os riscos ou desconfortos aos quais estarei submetido ao participar dessa pesquisa serão mínimos tendo em vista que são raros os casos de alergia à cerveja e seus sintomas muito semelhantes a outras alergias alimentares como desconforto gástrico, urticária e/ou dor de cabeça. Mesmo assim, existe a possibilidade que o participante desconheça possuir alergia a qualquer um dos ingredientes utilizados.
9. **Caso a bebida provoque alguma reação alérgica ou desconforto deverei entrar em contato com o pesquisador responsável;**
10. Não terei nenhuma despesa ao participar desse estudo;
11. Meu nome será mantido em sigilo, assegurando assim a minha privacidade e se

desejar, deverei ser informado sobre os resultados dessa pesquisa;

12. Poderei me recusar a participar ou mesmo retirar meu consentimento a qualquer momento da realização dessa pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo ou penalização;

13. Para qualquer dúvida ou solicitação de esclarecimentos, poderei entrar em contato com a equipe científica;

14. Não existem benefícios diretos para os voluntários desta pesquisa. Os riscos ou desconfortos aos quais estarei submetido ao participar dessa pesquisa serão mínimos e pouco prováveis, uma vez que todos os ingredientes utilizados na elaboração do produto já foram testados em humanos e serão submetidos a um rígido controle de qualidade antes da apresentação aos voluntários.

15. Para notificação de qualquer situação, relacionada com a ética, que não puder ser resolvida pelos pesquisadores deverei entrar em contato com o Comitê de Ética em

16. Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP, pelo telefone (0XX16) 3301-6897.

17. A colaboração dos mesmos será imprescindível para o desenvolvimento do projeto, possibilitando avaliar a aceitabilidade e intenção de compra desta nova bebida. Caso aceite fazer parte do estudo, assine este documento em duas vias. Uma via pertence a você e a outra ao pesquisador responsável.

18. Em caso de eventuais danos sofridos pelo participante da pesquisa, este fará jus à reparação;

19. O TCLE é um documento emitido em 2 vias, assinado em todas as folhas, sendo que uma via deve ficar com o participante da pesquisa e a outra com a pesquisadora.

Diante dos esclarecimentos prestados, concordo em participar, como voluntário (a), do estudo *“DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO COM CARACTERÍSTICAS ISOTÔNICAS”*

Araraquara, de 2018.

Assinatura do Voluntário: \_\_\_\_\_

Assinatura do Pesquisador: \_\_\_\_\_

Deborah Oliveira De Fusco

### Ficha para aplicação de teste de aceitação

Nome: \_\_\_\_\_ idade: \_\_\_\_\_

Amostra: \_\_\_\_\_

Prove a amostra e indique sua opinião em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, de acordo com a escala abaixo:

- |                               |                         |
|-------------------------------|-------------------------|
| 9 – gostei muitíssimo         | Aparência: _____        |
| 8 – gostei muito              | Aroma : _____           |
| 7 – gostei moderadamente      | Sabor: _____            |
| 6 – gostei ligeiramente       | Impressão Global: _____ |
| 5 – nem gostei/ nem desgostei |                         |
| 4 – desgostei ligeiramente    |                         |
| 3 – desgostei moderadamente   |                         |
| 2 – desgostei muito           |                         |
| 1 – desgostei muitíssimo      |                         |

**Assinale qual seria sua atitude em relação à compra do produto.**

- ( ) eu certamente compraria este produto
- ( ) eu provavelmente compraria este produto
- ( ) tenho dúvidas se compraria ou não este produto
- ( ) eu provavelmente não compraria este produto
- ( ) eu certamente não compraria este produto

Comentários: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Preencha abaixo com relação aos seus hábitos de consumo de cerveja e bebida isotônica. Caso goste ou beba os dois, assinalar ambos.**

- ( ) Gosto ou tomo cerveja
- ( ) Gosto ou tomo bebida isotônica

**Atividade Física:**

- ( ) Pratico 3 vezes por semana ou mais atividade física
- ( ) Pratico de 1 a 2 vezes por semana atividade física
- ( ) Não pratico atividade física

Comentários: \_\_\_\_\_

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** DESENVOLVIMENTO DE CERVEJAS SEM ÁLCOOL COM  
CARACTERÍSTICAS ISOTÔNICAS

**Pesquisador:** DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 60050016.8.0000.5426

**Instituição Proponente:** Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da  
UNESP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.068.055

**Apresentação do Projeto:**

O projeto tem como objetivo desenvolver uma bebida á base de malte de cevada sem álcool com características de bebida isotônicas. O projeto encontra-se bem redigido, porém, ainda não está claro como será removido o álcool, após o processo de fermentação.

**Objetivo da Pesquisa:**

Produzir uma bebida á base de malte de cevada sem álcool com características de bebida isotônicas.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos estão relacionados a alergias a produtos encontrados na bebida.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A Pesquisa está de acordo com as diretrizes traçadas por este Comitê.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

**Endereço:** Rodovia Araraquara Jaú, km 1

**CEP:** 14.801-902

**UF:** SP **Município:** ARARAQUARA

**E-mail:** sta@fcfar.unesp.br

Os termos foram apresentados e estão de acordo com as regras estabelecidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Aprovo, Ad referendum, o referido projeto de pesquisa, estruturado dentro dos padrões ético.

O relatório parcial deve ser entregue em OUTUBRO de 2017. E o relatório final e os Termos de Consentimento Livre Esclarecido (originais e assinados em todas as folhas) deverão ser entregues em AGOSTO de 2018.

### Considerações Finais a critério do CEP:

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_787573.pdf	15/05/2017 10:34:25		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle1105corrigido.docx	15/05/2017 10:30:57	DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_doutorado0802.docx	08/02/2017 10:21:17	DEBORAH OLIVEIRA DE FUSCO	Aceito
Outros	carta.pdf	08/02/2017 10:15:40	DEBORAH OLIVEIRA DE	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_etica_pdf.pdf	08/09/2016 16:42:37	DEBORAH OLIVEIRA DE	Aceito

### Situação do Parecer:

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP: Não**

ARARAQUARA, 17 de Maio de 2017

Assinado por: Adriano Mondini (Coordenador)

Endereço: Rodovia Araraquara Jaú, km 1

CEP: 14.801-902

UF: SP Município: ARARAQUARA

E-mail: sta@fcfar.unesp.br