

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE – UNICENTRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA –
PPGQA

GABRIELA DALBERTO

Desenvolvimento de cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico: Efeito do *cold mash* nas etapas de brassagem e fermentação e o uso de leveduras não-*Saccharomyces*

TESE DE DOUTORADO

GUARAPUAVA

2024

Gabriela Dalberto

CERVEJA SEM ÁLCOOL E DE BAIXO TEOR ALCOÓLICO: EFEITO DO COLD MASH NAS
ETAPAS DE BRASSAGEM E FERMENTAÇÃO E O USO DE LEVEDURAS NÃO-
SACCHAROMYCES.

Tese apresentada à Universidade Estadual do
Centro-Oeste, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em Química, área de
concentração em Química Aplicada, para a obtenção
do título de Doutor.

Aprovado em 8 de março de 2024.

Prof. Dr. Giancarlo Di Vaccari Botteselle (UNICENTRO)

Prof^a. Dr^a. Daiane Finger Ferreira (UNICENTRO)

Prof^a. Dr^a. Aline Coqueiro (UTFPR - Ponta Grossa)

Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha (UTFPR – Pato Branco)

Prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa (Orientador)

GUARAPUAVA-PR

2024

Catálogo na Publicação
Rede de Bibliotecas da Unicentro

- D137d Dalberto, Gabriela
Desenvolvimento de cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico : efeito do *cold mash* nas etapas de brassagem e fermentação e o uso de leveduras não-*Saccharomyces* / Gabriela Dalberto. -- Guarapuava, 2024. xiv, 104 f. : il. ; 28 cm
- Tese (doutorado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Química. Área de concentração: Química Aplicada, 2024.
- Orientador: Marcos Roberto da Rosa
Banca Examinadora: Giancarlo Di Vaccari Botteselle, Daiane Finger Ferreira, Aline Coqueiro, Mário Antônio Alves da Cunha
- Bibliografia
1. Brassagem a frio. 2. Fermentação. 3. Hidrólise enzimática. 4. Planejamento fatorial. 5. *Torulaspora delbrueckii*. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Química.

CDD 540



ePROCOLO

Correspondência Interna 199/2024.Documento: **folharosto.pdf**.

Assinatura Avançada realizada por: **Daiane Finger Ferreira (XXX.409.239-XX)** em 02/04/2024 14:58 Local: UNICE/DEQ, **Marcos Roberto da Rosa (XXX.703.889-XX)** em 03/04/2024 13:35.

Assinatura Simples realizada por: **Mário Antônio Alves da Cunha (XXX.348.920-XX)** em 02/04/2024 10:28, **Aline Coqueiro (XXX.854.499-XX)** em 02/04/2024 11:44 Local: CIDADAO, **Giancarlo Di Vaccari Botteselle (XXX.281.510-XX)** em 02/04/2024 14:24 Local: UNICE/DEQ.

Inserido ao documento **789.459** por: **Fauze Jaco Anaissi** em: 02/04/2024 09:52.



Documento assinado nos termos do Art. 38 do Decreto Estadual nº 7304/2021.

A autenticidade deste documento pode ser validada no endereço:
<https://www.eprotocolo.pr.gov.br/spiweb/validarDocumento> com o código:
8940013cb8b7294d2dbf1456a585589f.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus familiares, que sempre me apoiaram e acreditaram na realização deste sonho. Em especial ao meu irmão Henrique, minha mãe Luciane e ao meu pai Eristeu.

Ao João Paulo, pelo amor e dedicação a mim depositados.

A UNICENTRO, ao laboratório TECNORG e aos professores pelo suporte e ensinamentos.

Ao professor Marcos, pela orientação e incentivo na busca por conhecimento.

A cada pessoa que tenha contribuído de alguma forma, o meu agradecimento.

RESUMO

Repensar hábitos e buscar opções mais saudáveis de vida se tornou uma preocupação constante para a população. Dentre esses hábitos, o consumo excessivo de álcool figura como um dos principais, pois diversos estudos apontam a existência de aspectos negativos associados a esse comportamento. Nesse contexto, a cerveja sem álcool surge como uma opção atraente para quem busca um estilo de vida equilibrado, mas sem deixar de lado a experiência sensorial. Isso é viabilizado pela utilização de processos de fabricação inovadores, como é o caso da técnica de brassagem a frio, comumente chamada de *Cold Mash*, e o uso de leveduras do tipo não-*Saccharomyces*, que possuem baixo rendimento na produção de etanol durante seu metabolismo. Essas inovações permitem produzir cervejas sem álcool com perfil sensorial semelhante às cervejas tradicionais, atendendo à demanda crescente por opções saudáveis. Assim, o presente estudo buscou otimizar o desenvolvimento deste produto, realizando um estudo da etapa de brassagem, a fim de se avaliar como a técnica de *cold mash* pode influenciar nas características do mosto cervejeiro, e também um estudo de fermentação, onde promoveu-se modificações no tipo de levedura especial utilizada (*Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*) e na nutrição adicional dessas leveduras, por meio da aplicação de planejamento fatorial. As amostras foram analisadas por meio de seus parâmetros físico-químicos, teor de compostos fenólicos e proteínas, atividade antioxidante e perfil mineral. Para o estudo de brassagem, verificou-se que a técnica utilizada resulta em um mosto com menor concentração de carboidratos, o que possibilita obter-se menores quantidades de álcool, e que o tempo de extração de 24 horas mostrou-se adequado para preservar características fundamentais do estilo Pilsen. Em relação ao estudo de fermentação, observou-se que a associação entre o *cold mash* e as leveduras não-*Saccharomyces* resultou em cervejas com teor alcoólico inferior a 0,5% (v/v), classificadas como cerveja sem álcool pela legislação brasileira. Além disso, se observou atividade antioxidante superior ao reportado pela literatura, e teor de proteínas inferior ao encontrado para cervejas tradicionais. A análise sensorial realizada resultou em boa aceitação para as cervejas sem álcool. Assim, a bebida desenvolvida neste estudo demonstra potencial em contribuir de maneira positiva para a melhora de hábitos e na diminuição do consumo de álcool, por apresentar atributos sensoriais semelhantes aos das cervejas tradicionais oriundos da técnica *cold mash* e do uso da espécie de levedura *Torulaspora delbrueckii*.

PALAVRAS-CHAVE: brassagem a frio, fermentação, hidrólise enzimática, planejamento fatorial, *Torulaspora delbrueckii*

ABSTRACT

Rethinking habits and seeking healthier life options has become a constant concern for the population. Among these habits, excessive alcohol consumption is one of the most worrying, as several studies indicate the existence of negative aspects associated with this behavior. In this context, non-alcoholic and low-alcohol beers emerge as an attractive option for those looking for a balanced lifestyle, without leaving aside the sensorial experience. This is possible through the use of innovative manufacturing processes, such as the cold mash technique, and the use of non-*Saccharomyces* yeast, which do not have ethanol as the main product of their metabolism. These innovations make it possible to produce non-alcoholic and low-alcohol beers with a similar sensory profile to traditional beers, meeting the growing demand for healthy options. Thus, the present study sought to optimize the development of this product, carrying out a study of the brewing stage, in order to evaluate how the cold mash technique can influence the characteristics of the brewer's wort, and also a fermentation study, where the modifications in the type of special yeast used (*Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima*) and in the additional nutrition of these yeasts, through the application of factorial design. The samples were analyzed based on their physicochemical parameters, phenolic and protein content, antioxidant activity and mineral profile. For the brewing study, it was found that the technique used results in a wort with a lower concentration of carbohydrates, which makes it possible to obtain smaller amounts of alcohol, and that the extraction time of 24 hours proved to be adequate to preserve characteristics fundamentals of the Pilsen style. Regarding the fermentation study, it was observed that the association between cold mash and non-*Saccharomyces* yeast resulted in beers with an alcohol content of less than 0.5% (v/v), classified as non-alcoholic beer under Brazilian legislation. Furthermore, antioxidant activity was higher than that reported in the literature, and protein content was lower than that found for traditional beers. Thus, the drink developed in this study demonstrates the potential to contribute positively to improving habits and reducing alcohol consumption, as it presents sensory attributes similar to those of traditional beers derived from the cold mash technique and the use of the yeast species *Torulaspora delbrueckii*.

KEYWORDS: cold mash, fermentation, enzymatic hydrolysis, factorial design, *Torulaspora delbrueckii*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processo de produção da cerveja.	21
Figura 2. Conversão da amilose e amilopectina em maltose por ação de enzimas.	22
Figura 3. Visão geral do metabolismo de carboidratos para formação de compostos minoritários da fermentação alcoólica.....	24
Figura 4. Representação da técnica de brassagem <i>cold mash</i> (brassagem a frio).	27
Figura 5. Crescimento no consumo de cerveja sem álcool no Brasil entre os anos de 2017 e 2023.	31
Figura 6. Percentual de consumidores preocupados em diminuir a ingestão de álcool ao longo dos anos em diferentes faixas etárias.....	31
Figura 7. Mostos cervejeiros oriundos do estudo de brassagem utilizando a técnica <i>cold mash</i> . a) Brassagem a 7 °C por 12 h; b) Brassagem a 7 °C por 24 h; c) Brassagem a 9 °C por 12 h; d) Brassagem a 9 °C por 24 h.	37
Figura 8. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de sólidos solúveis das amostras de mosto (a), gráfico dos efeitos principais significativos tempo e temperatura de brassagem (b) e gráfico do efeito de interação AB (c).....	38
Figura 9. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro físico-químico de pH das amostras de mosto.	41
Figura 10. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro físico-químico de acidez total das amostras de mosto cervejeiro (a) e gráfico do efeito de interação entre temperatura de brassagem e tempo de brassagem (b).....	42
Figura 11. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro físico-químico de cor das amostras de mosto.	44
Figura 12. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro de teor de proteínas das amostras de mosto.	46
Figura 13. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor alcoólico (a), pH (c) e acidez total (d) das amostras de cerveja. Gráfico do efeito de interação entre tipo de levedura não- <i>Saccharomyces</i> e nutrição de levedura aplicado ao parâmetro de teor alcoólico (c).	56

Figura 14. Cervejas sem álcool produzidas pela técnica de *cold mash* utilizando: a) levedura *Torulaspora delbrueckii* b) levedura *Torulaspora delbrueckii* utilizando nutrição com *Servomyces*; c) levedura *Metschnikowia pulcherrima*; d) levedura *Metschnikowia pulcherrima* utilizando nutrição com *Servomyces*. 58

Figura 15. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de compostos fenólicos (a) e atividade antioxidante (c) das amostras de cerveja. Gráfico do efeito de interação entre tipo de levedura não-*Saccharomyces* e nutrição da levedura para o teor de compostos fenólicos (b)..... 61

Figura 16. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de zinco (a), cálcio (b), potássio (c), manganês (e) das amostras de cerveja. Gráficos do efeito de interação entre tipo de levedura não-*Saccharomyces* e nutrição da levedura para o teor de potássio (d) e manganês (f). 63

Figura 17. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor alcoólico (a). Gráfico dos efeitos principais proporção de levedura e nutrição da levedura (b) e gráfico do efeito de interação de dois fatores (c). 67

Figura 18. Cervejas de baixo teor alcoólico preparadas utilizando a técnica de *cold mash*. a) 6:4: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (60%) : *S. cerevisiae* (40%); b) 8:2: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (80%) : *S. cerevisiae* (20%); c) 6:4: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (60%) : *S. cerevisiae* (40%) com *Servomyces*; d) 8:2: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (80%) : *S. cerevisiae* (20%) com *Servomyces*. 69

Figura 19. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado à atividade antioxidante (a) e ao teor de compostos fenólicos (b). Gráfico dos efeitos principais (c) e do efeito de interação de dois fatores para o teor de compostos fenólicos (d)..... 70

Figura 20. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de zinco (a) e cálcio (b)..... 72

Figura 21. Cervejas produzidas utilizando: a) levedura *Torulaspora delbrueckii*, b) levedura *T. delbrueckii* com nutrição utilizando *Servomyces* (TdS); b) cerveja padrão. 77

Figura 22. Frequência de consumo para as cervejas avaliadas em porcentagem de participantes..... 80

Figura 23. Qualidade das cervejas avaliadas em porcentagem de participantes. 81

Figura 24. Escolha dos participantes quanto a semelhança a uma cerveja Pilsen tradicional: cerveja mais parecida, cerveja de semelhança intermediária e cerveja menos parecida..... 82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperatura e pH favoráveis de atuação das enzimas.	22
Tabela 2. Classificação da cerveja pela cor	25
Tabela 3. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2 ² para otimização da etapa de brassagem no processo produtivo de cervejas de baixo teor alcoólico e sem álcool.	35
Tabela 4. Efeitos médios calculados e seus erros padrão aplicado na otimização da etapa de brassagem do processo cervejeiro para o planejamento fatorial 2 ²	36
Tabela 5. Valores médios para o parâmetro físico-químico de teor de sólidos solúveis e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	37
Tabela 6. Valores médios para o parâmetro físico-químico de pH e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	39
Tabela 7. Valores médios para o parâmetro físico-químico de acidez total e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	41
Tabela 8. Valores médios para o parâmetro físico-químico de cor e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	43
Tabela 9. Valores médios para o teor de proteínas e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	45
Tabela 10. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2 ² para a otimização do processo produtivo de cervejas sem álcool.	50
Tabela 11. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2 ² para a otimização do processo produtivo de cervejas de baixo teor alcoólico.	50
Tabela 12. Valores médios para o parâmetro físico-químico de teor de sólidos solúveis e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	54
Tabela 13. Valores médios para os parâmetros de teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e teor de proteínas totais e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	60
Tabela 14. Valores médios para o perfil mineral e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	64
Tabela 15. Valores médios para os parâmetros físico-químicos e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	66
Tabela 16. Valores médios para os parâmetros de teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e teor de proteínas e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	71

Tabela 17. Valores médios para o perfil mineral e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2 ²	73
Tabela 18. Notas obtidas para os atributos sensoriais avaliados na cerveja padrão e cervejas sem álcool.	78
Tabela 19. Notas obtidas para a frequência de consumo e a qualidade da cerveja padrão e cervejas sem álcool.....	79

Sumário

1.	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	15
1.1	Introdução	15
1.2	Objetivos	17
1.1.1	Objetivo geral	17
1.1.2	Objetivos específicos	17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	Definição e classificação.....	19
2.2	Saúde e bem-estar	20
2.3	Processo de produção.....	21
2.4	Perfil sensorial	24
2.5	Cold mash	26
2.5.1	Atuação do <i>cold mash</i>	27
2.6	Leveduras não- <i>saccharomyces</i>	27
2.6.1	<i>Torulaspora delbrueckii</i>	28
2.6.2	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	29
2.7	Tendências de mercado.....	30
3.	ESTUDO DE BRASSAGEM.....	34
3.1	Experimental.....	34
3.1.1	Matérias primas	34
3.1.2	Produção do mosto cervejeiro	34
3.1.3	Estudo de otimização	34
3.1.4	Caracterização físico-química.....	35
3.2	Resultados e Discussão	35
3.3	Conclusões parciais	46
4.	ESTUDO DE FERMENTAÇÃO	49
4.1	Experimental.....	49

4.1.1 Matérias primas	49
4.1.2 Preparo das amostras de cerveja	49
4.1.3 Estudo de otimização	49
4.1.4 Caracterização físico-química.....	51
4.1.5 Perfil Mineral.....	51
4.1.6 Atividade Antioxidante.....	52
4.1.7 Teor de Fenólicos	52
4.2 Cerveja sem álcool.....	52
4.2.1 Resultados e Discussão.....	52
4.3 Cerveja de baixo teor alcoólico	65
4.3.1 Resultados e Discussão.....	65
4.4 Conclusões parciais	74
5. ANÁLISE SENSORIAL	76
5.1 Materiais e métodos	76
5.1.1 Análise estatística dos dados	76
5.2 Resultados e Discussão	77
5.3 Conclusões parciais	82
6. CONCLUSÃO	84
7. REFERÊNCIAS	85
ANEXOS	96

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EBC	<i>European Brewery Convention</i>
°Bx	Grau Brix
IBU	<i>International Bitterness Unit</i>
BJCP	<i>Beer Judge Certification Program</i>
ASBC	<i>American Society of Brewing Chemists</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
Td	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Mp	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1 Introdução

A procura por hábitos de vida saudáveis e equilibrados faz com que o consumo excessivo de álcool se torne uma preocupação, em decorrência dos impactos adversos que essa prática traz sobre a saúde, uma vez que diversas pesquisas mostram relações entre esse excesso e a incidência de doenças hepáticas, cardíacas e certos tipos de cânceres (Gaetano *et al.*, 2016; Mateo-Gallego *et al.*, 2020; Grao-Cruces *et al.*, 2022; Kang *et al.*, 2023).

Neste contexto, as cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico surgem como alternativa para aqueles que buscam controlar o consumo de álcool e promover hábitos mais saudáveis, pois oferece uma opção que mantém o perfil sensorial característico da cerveja, mas com um teor alcoólico baixo (geralmente entre 0,5% e 2,0%) (De Francesco *et al.*, 2018; Gernat *et al.*, 2020). A adoção desses hábitos pode ser um passo positivo na promoção de um estilo de vida equilibrado e na redução dos impactos adversos à saúde associados ao consumo excessivo de álcool (Liu *et al.*, 2022; Gloppen, Roesler & Farley, 2022; Staub *et al.*, 2022;).

Essas cervejas são produzidas usando o mesmo processo da cerveja normal, mas com uma diferença: o álcool é removido ou reduzido por meio de diferentes métodos. Alguns dos métodos mais utilizados são a destilação a vácuo, a técnica de osmose reversa, ou ainda métodos biológicos, como o uso de cepas de levedura que produzam menos álcool durante o processo de fermentação ou a própria interrupção da fermentação (Buglass, 2011; Branyik *et al.*, 2012; Johansson *et al.*, 2021; Roca-Mesa *et al.*, 2022). Cada técnica tem suas vantagens e desvantagens, e a escolha do método depende de vários fatores como custo, disponibilidade de equipamento e perfil sensorial desejado (Gernat *et al.*, 2020; Lamiquiz-Moneo *et al.*, 2021; Sánchez *et al.*, 2021).

Alguns desses processos podem impactar negativamente essas características físicas e sensoriais, resultando em uma bebida que pode não se assemelhar à cerveja tradicional ou exigir tecnologias mais caras, o que pode impactar no preço de venda dessas bebidas (Blackmore, Hidrio, Yeomans, 2022; Canonico *et al.*, 2023).

A procura por cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico aumentou significativamente nos últimos anos, levando a um aumento do investimento em pesquisa e desenvolvimento de novas técnicas de produção. Como resultado, muitas cervejarias poderão

ser capazes de produzir cervejas com menor quantidade de álcool de alta qualidade a um custo menor, tornando-a mais acessível e atrativa aos consumidores (Szollosi *et al.*, 2016; Gschaedler, 2017; De Francesco *et al.*, 2018; Bellut *et al.*, 2019).

Diante do exposto, a técnica de *Cold Mash* emerge como uma inovação no ramo cervejeiro, pois consiste em um método em que as enzimas presentes no malte atuem de maneira mais lenta, diminuindo a extração de açúcares e, em consequência, resultando em teores alcoólicos menores. Ao mesmo tempo, o contato entre os grãos de malte e a água ocorre por mais tempo, propiciando um aumento na intensidade de cor, sabores e aromas provenientes do malte (Dalberto *et al.*, 2021; Dalberto, Niemes, da Rosa, 2023).

Desta forma, o desenvolvimento de novas técnicas e tecnologias faz com que a cerveja sem álcool se torne uma opção viável e interessante para os consumidores, atraindo aqueles que desejam adotar um estilo de vida mais saudável e equilibrado, mas podendo ainda desfrutar os sabores e aromas da bebida e de momentos de sociabilidade (Lamiquiz-Moneo *et al.*, 2021).

Utilizar apenas a técnica de *Cold Mash* no preparo de cervejas irá resultar em cervejas de baixo teor alcoólico, ou seja, entre 0,5 e 2,5% (v/v), de acordo com a legislação brasileira, como reporta Dalberto e colaboradores (2021). Assim, o presente estudo buscou associar essa técnica inovadora com a utilização de leveduras não-*Saccharomyces*, que possuem a tendência de converter os açúcares fermentáveis em compostos de aroma ao invés do etanol, propiciando a obtenção de cervejas sem álcool (até 0,5% (v/v)).

1.2 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

Estudar a influência da associação entre a técnica de brassagem *cold mash* e o uso de leveduras não-*Saccharomyces* para o preparo de cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico, a fim de se avaliar como essas técnicas modificam determinadas características da cerveja.

1.1.2 Objetivos específicos

Estudar diferentes condições experimentais do processo produtivo com o objetivo de produzir cervejas com teor alcoólico entre 0,5 e 2,0% e abaixo de 0,5% de álcool por meio da aplicação da técnica de brassagem *cold mash*;

Fermentar o mosto resultante utilizando leveduras não-*Saccharomyces*;

Otimizar as etapas de brassagem e fermentação do processo de produção de cervejas de baixo teor alcoólico e sem álcool por meio de planejamento fatorial;

Caracterizar as bebidas determinando o teor alcoólico e demais parâmetros físico-químicos, bem como determinar o perfil mineral das cervejas finalizadas;

Realizar análise sensorial para testes de aceitação utilizando escala hedônica;

CAPÍTULO 2: REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Definição e classificação

A cerveja é definida como uma bebida alcoólica fermentada, produzida mediante o processo de fermentação do mosto proveniente de cereais maltados e não maltados, com destaque para o malte de cevada. Além do malte, também se utiliza no processo de produção outras matérias primas fundamentais: água, lúpulo e levedura (Rosa; Afonso, 2015; Brasil, 2019; Coelho Neto *et al.*, 2020). As proporções, a origem e o processamento desses insumos resultam em diferentes estilos cervejeiros, como a cerveja Pilsen, a India Pale Ale (IPA), Red, Bock, Stout, entre outros (Bettenhausen *et al.*, 2018; BJCP, 2021).

Em razão dessa diversidade de características, as cervejas têm diferentes classificações segundo a legislação de cada país. No Brasil, elas são classificadas segundo a coloração: cor clara quando possuir menos que 20 EBC (*European Brewing Convention*, escala de unidades de cor), e escura, quando maior que 20 EBC; proporção de malte, que divide-se em puro malte, cerveja de outros cereais (como a cerveja de trigo) e apenas como cerveja (aquela que contém adjuntos como milho, arroz, aveia); graduação alcoólica: cerveja sem álcool, quando contém até 0,5% (v/v) de graduação alcoólica, cervejas com teor reduzido (0,5 a 2,0% v/v), também chamadas de cervejas de baixo teor alcoólico, e cerveja com teores superiores a 2,0% (v/v) de álcool (Brasil, 2019).

Além do disposto em legislação, uma outra forma de classificação muito utilizada no universo cervejeiro é o Guia de Estilos de Cerveja, do BJCP (*Beer Judge Certification Program*), onde leva-se em consideração outras variáveis: tipo de levedura (*lager*, *ale*, selvagem, bactérias ou não-*Saccharomyces*), tipos de malte (diferentes intensidades de torrefa e variedade do grão, podendo ser cevada, aveia, trigo, etc), amargor (variações de lúpulo) e cor irão impactar de diferentes formas nas cervejas produzidas (BJCP, 2021).

A cerveja mais amplamente consumida em todo o mundo pertence ao estilo Pilsen (Morado, 2009; Buglass, 2011). Pertencente à categoria das *lagers*, é obtida por meio de baixa fermentação, apresentando uma coloração clara, corpo leve e um equilíbrio notável entre sabor e aroma. Esse estilo cervejeiro apresenta subdivisões, onde uma variante popular no Brasil é a *Standard American Lager*, que se distingue da cerveja pilsen original por ter amargor, sabores e aromas mais suaves e corpo mais leve (BJCP, 2021; Mutz *et al.*, 2021). A aceitação dessa cerveja no Brasil é atribuída ao clima, que favorece a preferência por bebidas mais leves e refrescantes (Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014).

2.2 Saúde e bem-estar

O consumo moderado de cerveja tem sido associado a potenciais benefícios para a saúde devido ao seu valor nutricional, pois a bebida possui em sua composição antioxidantes, representado pelos compostos fenólicos, que podem ajudar a combater o estresse oxidativo no corpo, e também atuar como neuroprotetores (Kang *et al.*, 2023; Coulibaly *et al.*, 2023). Estudos indicam que o consumo moderado de cerveja, quando associado a uma dieta equilibrada, pode estar relacionado a benefícios cardiovasculares, pois os antioxidantes presentes na cerveja podem ajudar a aumentar os níveis de colesterol bom (HDL) e reduzir a formação de coágulos sanguíneos, proporcionando uma possível proteção contra doenças do coração (Branyik *et al.*, 2012; Gaetano *et al.*, 2016; Hinojosa-Avila *et al.*, 2024).

Esse grupo de compostos antioxidantes é proveniente das matérias primas utilizadas na produção da cerveja (Coelho Neto *et al.*, 2020). O lúpulo, além da função sensorial, também atua como um conservante natural da bebida. Dentre os compostos com potencial benéfico, destaca-se o xanthohumol, do grupo dos flavonoides, que mostrou-se capaz de melhorar o fluxo sanguíneo cerebral e inibir formação de coágulos, a lupulina, com propriedades antibacterianas e antimicrobianas, contribuindo para a preservação da cerveja ao inibir o crescimento de bactérias indesejadas, alfa e beta-ácidos e humuleno, com potencial anti-inflamatório, e quercetina, com propriedade antioxidante (Gasiński *et al.*, 2022; González-Salitre *et al.*, 2023).

Já o malte fornece vitaminas do complexo B, que atuam no sistema nervoso e imunológico, minerais, como potássio, magnésio, cálcio (composição dos ossos, contração e recuperação muscular), fibras (manutenção intestinal), carboidratos, principal fonte de energia para o desempenho de diversas atividades e aminoácidos, com função de reparação muscular, resistência física, síntese de proteínas, contribuindo para uma dieta equilibrada (Coelho Neto *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2022).

Além disso, o principal produto formado pela fermentação alcoólica, o etanol, também apresenta benefícios ao organismo, contribuindo para o aumento do colesterol HDL, redução de triglicerídeos, combate à *helicobacter pylori* (infecta a mucosa do estômago), melhora na biodisponibilidade dos flavonoides, entre outros (Coelho Neto *et al.*, 2020; Ramanan *et al.*, 2024). Porém, esse potencial benéfico só é alcançado quando a ingestão de álcool ocorre em pequenas quantidades, pois concentrações elevadas trarão mais malefícios do que vantagens (Grao-Cruces *et al.*, 2022).

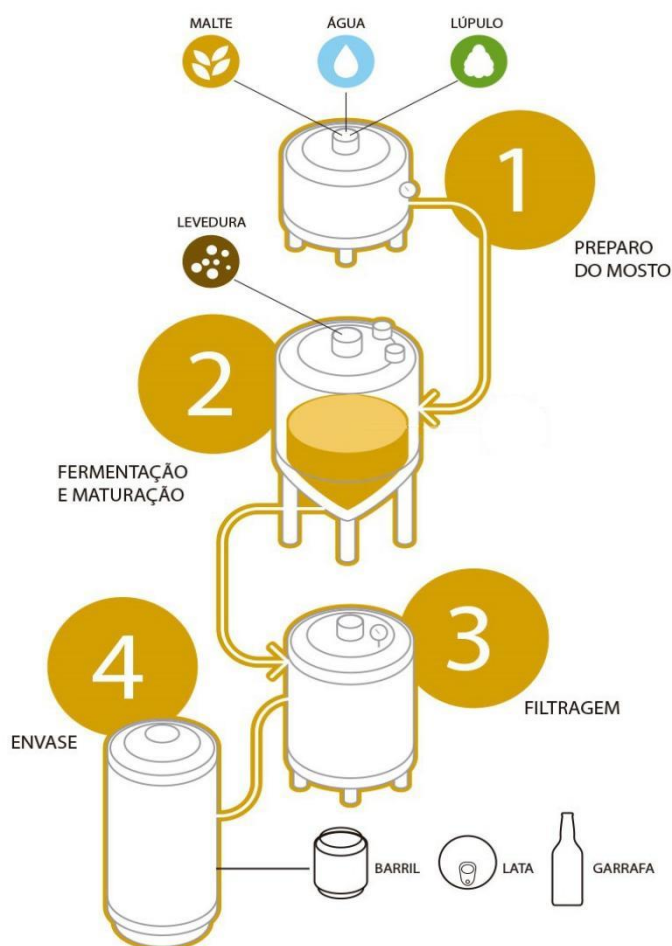
Assim, bebidas que já possuem quantidades limitadas de álcool, como as cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico, podem contribuir para essa ingestão equilibrada e consciente,

ao mesmo tempo que permite momentos de lazer e socialização e propicia o aproveitamento dos aspectos positivos relacionados à saúde e ao bem-estar (Staub *et al.*, 2022).

2.3 Processo de produção

Na produção de uma cerveja tradicional existem diversas etapas importantes do processo, sendo quatro as etapas principais: brassagem, fervura, fermentação e maturação (Rosa; Afonso, 2015). Um esquema sobre algumas das etapas para a obtenção da cerveja é apresentado na **Figura 1**.

Figura 1. Etapas do processo de produção da cerveja.



Fonte: CervBrasil (2015).

O primeiro estágio, denominado brassagem, tem como principal objetivo a hidrólise enzimática do amido contido nos diferentes tipos de cereais maltados. Nessa etapa se extrai cerca de 65% dos sólidos totais do malte, que juntamente com a água, constitui o mosto para a

fermentação. Para que a hidrólise amilácea ocorra, utiliza-se escala de temperaturas e pH adequados (**Tabela 1**), pois isso irá possibilitar uma boa atuação das enzimas responsáveis pela quebra do amido (Rosa; Afonso, 2015; Villacreces et al., 2022; Romero-Rodríguez et al., 2022).

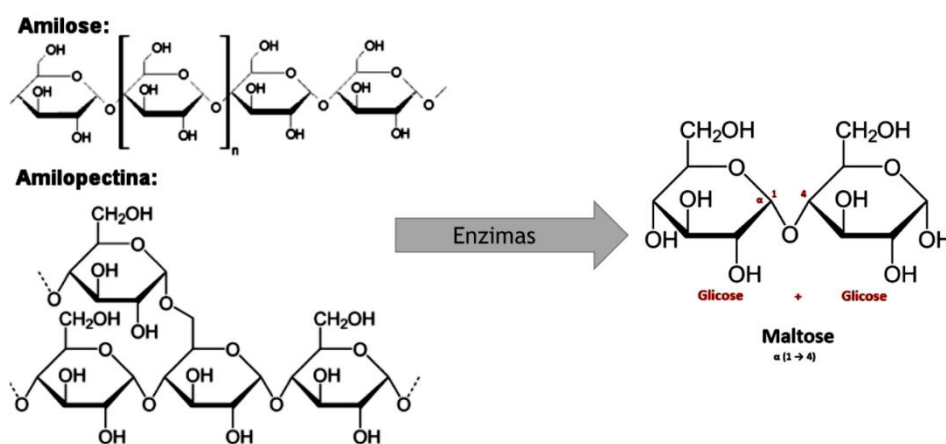
Tabela 1. Temperatura e pH favoráveis de atuação das enzimas.

Enzima	Temperatura (°C)	pH
Glucanases	35-45	5,0
Proteases	45-55	5,2-5,6
β -amilase	60-65	5,4-5,6
α -amilase	70-75	5,6-5,8

Fonte: Oliveira; Storto, 2017

A importância deste processo reside no fato de as leveduras cervejeiras não apresentarem as enzimas amiláceas em seu ciclo metabólico. Com isso, as enzimas contidas e ativadas durante o processo de malteação (α -amilase e β -amilase) irão atuar sobre o amido (**Figura 2**), convertendo a amilose e a amilopectina em maltose (dissacarídeo de glicose) (Bettenhausen *et al.*, 2018; Coelho Neto *et al.*, 2020).

Figura 2. Conversão da amilose e amilopectina em maltose por ação de enzimas.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

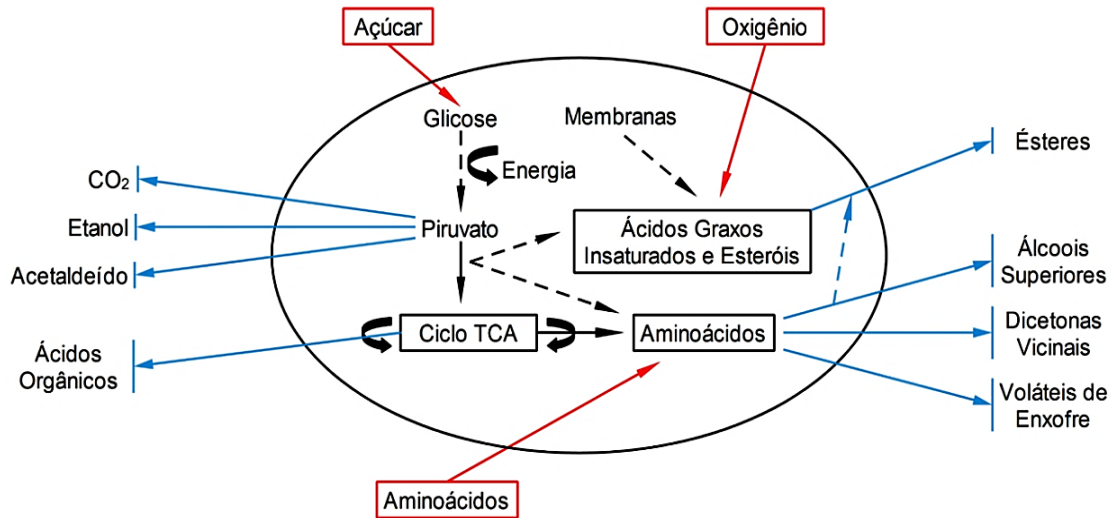
Como produto dessa quebra, o mosto final obtido é composto então por glicose, maltose e maltotriose, chamados açúcares fermentáveis, que são os carboidratos que as leveduras utilizam na etapa de fermentação (Bortoli *et al.*, 2013). Ao final desse processo, se realiza uma filtração para retirada de material particulado, para em seguida se prosseguir para a etapa de fervura do mosto formado (Villacreces et al., 2022).

A fervura se inicia quando a temperatura do mosto atinge a ebulição da água, e nesse momento é adicionado o lúpulo, responsável por conferir amargor e aromas. Utiliza-se essa matéria prima em dois momentos: no início e ao final da fervura. No início, tem-se a formação do amargor, que é medido pela escala *International Bitterness Unit* (IBU), e ao final, maior contribuição com aroma e sabor (Rosa; Afonso, 2015; Coelho Neto *et al.*, 2020).

O estágio da fervura também é responsável por outros processos, como a desnaturação de proteínas e assepsia do mosto. Isso é importante para garantir que apenas as leveduras adicionadas irão agir no processo, evitando a formação de compostos indesejados. Neste momento temos a formação do *trub* quente (aglomerado de proteínas desnaturadas e partes insolúveis do lúpulo), e então, o mosto é resfriado e transferido para o tanque de fermentação (Rosa; Afonso, 2015; Coelho Neto *et al.*, 2020).

Durante a etapa de fermentação, de acordo com o metabolismo das leveduras *Saccharomyces*, a glicose (derivada da maltose) é consumida em duas fases: o catabolismo (respiração aeróbica), onde ocorre a replicação celular, seguida pela fase do anabolismo (respiração anaeróbica), com a formação de etanol e gás carbônico. Além dessa reação principal da fermentação alcoólica, ocorre várias outras reações de formação de compostos secundários, especialmente ácidos, ésteres e álcoois superiores (**Figura 3**) (Scarano *et al.*, 2018; Coelho Neto *et al.*, 2020; Vrzal *et al.*, 2023).

Figura 3. Visão geral do metabolismo de carboidratos para formação de compostos minoritários da fermentação alcoólica.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Terminado o processo de fermentação, a cerveja irá passar para a fase de maturação, onde a temperatura é abaixada cerca de 10°C em relação a temperatura utilizada na fermentação. Com isso, outros processos irão ocorrer, como a clarificação do mosto, formando assim o *trub* frio, e levando ainda a uma segunda fermentação, que irá auxiliar na re-metabolização de alguns compostos sulfurados, como o dimetilsulfureto (DMS) e o sulfeto de hidrogênio, que são considerados compostos indesejáveis e que podem trazer sabores e aromas desagradáveis. Ainda é possível observar a formação de ésteres, que irão contribuir de forma positiva para a qualidade final da cerveja (Neves, 2018; Bossaert *et al.*, 2022).

Por fim, realiza-se a carbonatação da cerveja, que será envasada em diferentes apresentações, sendo mais comum o barril, a lata e a garrafa. Neste momento, poderá ser optado por uma cerveja "viva" ou pasteurizada (aquecimento da cerveja a uma temperatura entre 60 e 70°C por uma fração de tempo, elevando o tempo de prateleira). Pode-se, ainda, realizar a filtração, com a função de eliminar os resíduos de levedura da fermentação, deixando o paladar da cerveja mais límpido (Rosa; Afonso, 2015; Coelho Neto *et al.*, 2020; Bossaert *et al.*, 2022).













2.4 Perfil sensorial

Em função da grande variedade de estilos cervejeiros, as cervejas devem possuir algumas características sensoriais para pertencer a um determinado grupo, que incluem cor,

amargor, perfil de aromas e sabores, corpo e teor alcoólico (Bettenhausen *et al.*, 2018; Da Silva *et al.*, 2021; BJCP, 2021).

A cerveja do estilo *American Standard Lager* é descrita como uma cerveja clara, com cor entre 4 e 8 EBC, traduzindo-se por essa escala como amarelo palha a amarelo (**Tabela 2**), apresentando também um colarinho de espuma branco e pouco persistente, e aspecto visual límpido (EBC, 2015). Na boca se espera uma sensação de corpo baixo a médio, com carbonatação elevada, trazendo ao palato uma sensação de leve picância. É esperado sabores leves e neutros, podendo, ainda, apresentar sabores levemente maltados. Em relação ao amargor, será baixo, para estabelecer um equilíbrio com as demais características do estilo (BJCP, 2021).

Tabela 2. Classificação da cerveja pela cor.

Cor	Estilo da Cerveja	EBC	Coloração Observada
Água	-	0	
Amarelo-palha	Lite American Lager	4-6	
Amarelo	German Pilsen	6-8	
Dourado	Dortmunder Export	10-12	
Âmbar	Maibock	12-18	
Cobre-claro	California Common Beer	20-28	
Cobre	Roggenbier	28-33	
Marrom-claro	Roggenbier	33-35	
Marrom	Southern English Brown Ale	37-43	
Marrom-escuro	Robust Porter	37-59	
Marrom muito escuro	Sweet Stout	59-69	
Preto	Foreign Extra Stout	69	
Preto opaco	Russian Imperial Stout	79	

*EBC (European Brewing Convention). Fonte: BJCP (2021).

Já o perfil de lúpulos poderá ser floral, picante ou herbal, sempre com leveza. Como se trata de uma cerveja do tipo *lager*, o perfil de sabores da fermentação deve ser límpido, ou quase inexistente, deixando uma sensação de secura no paladar, pois a levedura deve consumir quase todos os carboidratos que trazem dulçor. Esta característica, associada a alta carbonatação, traz a este estilo de cerveja a refrescância esperada (Moura-Nunes *et al.*, 2016; Mutz *et al.*, 2021; Gasiński *et al.*, 2022).

Esse estilo pode apresentar variações, podendo ser preparada utilizando apenas malte de cevada, ou ainda receber a adição dos chamados adjuntos cervejeiros, como milho, arroz ou até açúcar de mesa (sacarose). A utilização desses adjuntos não pode exceder 40% do total de matérias primas amiláceas, de acordo com o BJCP (2021). Já a legislação brasileira permite até 45% (Brasil, 2019). A utilização desses cereais irá impactar no perfil sensorial, com aromas mais adocicados. Por fim, a formação de conteúdo de álcool deve estar entre 4,2 a 5,3%, segundo o BJCP, e de acordo com o disposto na legislação, deve ser superior a 2,0 % (Brasil, 2019; BJCP, 2021).

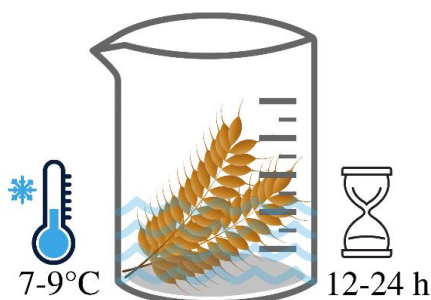
2.5 Cold mash

A brassagem a frio, conhecida na comunidade cervejeira como *cold mash*, é uma técnica inovadora que vem ganhando popularidade devido às suas características diferenciadas. Em comparação com os demais métodos de brassagem, é considerada uma prática recente, sendo disseminada prioritariamente de maneira informal entre os cervejeiros e possuindo seus registros em sites e blogs dedicados à produção de cervejas (Dalberto *et al.*, 2021).

A primeira citação deste tipo de brassagem foi feita em 2016, pela empresa Briess, fabricante de malte e insumos para indústria cervejeira e alimentícia (Briess, 2019), em seu site institucional. Já a primeira reportagem científica do *cold mash*, até onde se tem conhecimento, é feita por Dalberto e colaboradores (2021), onde a técnica é explorada no desenvolvimento de cervejas de baixo teor alcoólico.

Esta técnica consiste em adicionar água ao malte triturado e deixar esta mistura em repouso em temperaturas amenas, normalmente entre 8 e 15°C, por períodos mais longos em comparação a brassagem a quente, de no mínimo 24 horas (**Figura 4**). Os objetivos da brassagem a frio é extrair cor dos maltes para as cervejas de forma mais intensa, comparado às técnicas tradicionais, assim como conferir mais corpo para a bebida (sensação na boca). Ao mesmo tempo, se obtém menor quantidade de açúcares fermentescível, pois a extração é mais lenta devido à baixa temperatura (Dalberto *et al.*, 2021; Dalberto, Niemes, da Rosa, 2023).

Figura 4. Representação da técnica de brassagem *cold mash* (brassagem a frio).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

2.5.1 Atuação do *cold mash*

Nos estudos desenvolvidos por Dalberto e colaboradores (2021), observou-se, por meio da quantificação de açúcares fermentáveis (glicose e maltose) no mosto e nas cervejas, que a utilização da brassagem a frio resulta em concentrações menores desses carboidratos. Ao mesmo tempo, a determinação do teor de sólidos solúveis total do mosto, onde se insere todos os açúcares, tanto fermentáveis quanto não fermentáveis, apontou que os mostos em que se utiliza esta técnica se apresentam compostos prioritariamente pelos açúcares não fermentáveis, de cadeias longas (Dalberto *et al.*, 2021).

Essas espécies, chamadas dextrinas, possuem a característica de não conferir dulçor para a cerveja, e contribuem para um corpo mais pronunciado na bebida. Desta forma, torna-se possível a obtenção de cervejas similares às tradicionais, onde não prevalece o sabor adocicado e a bebida não parece muito diluída (Coelho Neto *et al.*, 2020).

Por este motivo e devido às demais características resultantes da brassagem a frio, esta técnica pode ser utilizada para produzir cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico, mantendo os aspectos sensoriais das cervejas tradicionais. Uma menor extração de açúcares fermentáveis irá resultar em menor teor alcoólico, ao mesmo tempo em que as demais características da cerveja tradicional, como coloração, sabores, aromas e corpo, serão semelhantes (Dalberto *et al.*, 2021; Schöttke; Rögener, 2021; Cappelin, 2023; Dalberto, Niemes, da Rosa, 2023).

2.6 Leveduras não-*Saccharomyces*

Inicialmente, o processo de fermentação era baseado em leveduras contidas no ambiente, chamadas leveduras selvagens, e atualmente, denominadas não-*Saccharomyces* (Branyik, 2012; Adamenko *et al.*, 2020). Com o advento do processo de pasteurização, ocorreu

também a identificação das leveduras específicas para a fermentação, e assim, as leveduras derivadas da *Saccharomyces cerevisiae* foram escolhidas como padrão para produção dos mais diferentes tipos de bebidas alcoólicas, sendo chamadas de leveduras selecionadas. Isso permitiu maior controle do processo cervejeiro, pois as leveduras selvagens resultavam em compostos sensorialmente indesejáveis. Assim, por muitos anos, apenas as leveduras do gênero *Saccharomyces* foram utilizadas (Gschaedler, 2017; Belutti; Arendt, 2019).

Anos depois, surgiram estudos demonstrando a importância das leveduras não-*Saccharomyces* no processo de fermentação, contribuindo de maneira positiva na complexidade, aroma, e textura dos fermentados, ganhando atenção crescente na indústria cervejeira. Recentemente, 37 espécies de leveduras deste tipo foram mencionadas na produção de vinhos, tequila, mezcal, cachaça e cervejas. Elas pertencem a 20 gêneros: *Aureobasidium*, *Brettanomyces*, *Candida*, *Clavispora*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Hanseluna*, *Issatchenkia*, *Kluyveromyces*, *Lachancea*, *Metschnikowia*, *Meyerozyma*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Starmerella*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora* e *Zygosaccharomyces* (Gschaedler, 2017; De Francesco *et al.*, 2018; Canonico *et al.*, 2021).

Essa grande variedade de novas leveduras permitiu a pesquisa e criação de diferentes bebidas, trazendo novos sabores, aromas e texturas. Assim, a busca e utilização das leveduras do tipo não-*Saccharomyces* vem ganhando espaço, com estudos sobre sua utilização e o impacto no produto final. Um exemplo é a levedura *Dekkera/Brettanomyces*, que vem sendo amplamente utilizada na produção de cervejas do tipo *sour*, caracterizadas pelo sabor ácido, e que vem ganhando espaço e apreço dos consumidores. Isso propiciou o surgimento do primeiro estilo de cerveja criado no Brasil, chamado Catarina *sour* (Sales; Souza, 2021; Da Silva *et al.*, 2023).

Além desse exemplo citado, pode-se destacar também as espécies *Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*, comumente utilizadas como leveduras auxiliares a *Saccharomyces cerevisiae* (Miguel *et al.*, 2022; Roca-Mesa, 2022).

2.6.1 *Torulaspora delbrueckii*

A *Torulaspora delbrueckii* é uma levedura conhecida há mais de 4000 anos, e é muito estudada na fermentação controlada de vinhos devido a sua capacidade de produzir sabores frutados na bebida. Outros autores ainda reportam que a *T. delbrueckii* é também utilizada na produção de cervejas de trigo Bávaras. Esta levedura tem uma característica particular de suportar pressões osmóticas elevadas durante a fermentação, e ainda ser crio-tolerante, ou seja,

capaz de fermentar a baixas temperaturas e necessitar de oxigênio durante este processo (Basso *et al.*, 2016; Gabbardo, 2020; Canonico *et al.*, 2023; He *et al.*, 2023).

A *T. delbrueckii* tem capacidade de fermentar a maltose, por meio da presença da enzima maltase em seu metabolismo, e isso a torna uma levedura muito interessante para utilização na produção de cervejas, pois este é o carboidrato mais abundante no mosto obtido a partir dos cereais maltados. Outro potencial desta levedura é a capacidade de utilizar a maltotriose em seu metabolismo. Também apresenta inibição por alta concentração de glicose, ou seja, se estiver presente no mosto, será o primeiro carboidrato a ser consumido (Basso *et al.*, 2016; He *et al.*, 2023).

Sua utilização em associação com as leveduras *Saccharomyces* é viabilizada por sua alta tolerância ao etanol, suportando concentrações de até 11% na produção de vinhos. Para as cervejas, estudos recentes mostram que ela tolera teores de até 5%. Outro diferencial da *T. delbrueckii* é sua tolerância aos iso-alfa-ácidos contidos no lúpulo, com estudos que demonstram que a concentração destes compostos pode chegar a 90 ppm, correspondente a estilos de cervejas de alto amargor. Essa capacidade é positiva, pois demonstra que a levedura suporta o efeito antimicrobiano do lúpulo (Canonico *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023).

Talvez a contribuição mais interessante desta levedura seja sua capacidade de produzir compostos voláteis na cerveja. Basso e colaboradores (2016) reportam que a *T. delbrueckii* é capaz de produzir 2-fenil-etanol (sabor adocicado, pétalas de rosas e floral), n-propanol e isobutanol, álcool isoamílico (aroma de conhaque) e acetato de etila. Também é capaz de produzir pequenas quantidades de acetato de isoamila, além de não ser comum a produção de *off-flavors* (Basso *et al.*, 2016).

2.6.2 *Metschnikowia pulcherrima*

A *Metschnikowia pulcherrima* é outra levedura não-*Saccharomyces* que vem ganhando espaço, sendo utilizada em inoculação sequencial com a *Saccharomyces cerevisiae* na produção de vinhos com menores teores de álcool. Assim como a *T. delbrueckii*, contribui para melhoria e modificação dos sabores e aromas da bebida final. A *M. pulcherrima* é uma levedura que possui atividade enzimática β -glucosidase, atividade proteolítica e baixíssima tolerância ao etanol, com isso, há uma pequena redução nos teores de álcool da bebida (Zhang *et al.*, 2022; Binati *et al.*, 2023).

Gabbardo (2020) reporta que a *M. pulcherrima* tem moderada produção de ácido acético e capacidade de reduzir a formação de H₂S durante a fermentação, fatores positivos para produção de bebidas, pois esses dois compostos são considerados *off-flavors*. Outro ponto de

destaque é a intermediária produção de cetonas quando comparada com as *S. cerevisiae*, apresentando ainda baixa sensibilidade ao SO₂. De modo geral, a justificativa para estudos e utilização da *M. pulcherrima* em bebidas é sua alta capacidade de metabolizar os carboidratos em ésteres, apresentando também alta formação de álcoois superiores, como isobutanol e feniletanol (Gabbardo, 2020; Binati *et al.*, 2023).

Neste contexto, as variedades de leveduras *Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*, normalmente utilizadas na produção de vinhos, mostram-se interessantes para a produção de cervejas com menor teor de álcool, pois não há formação prioritária de etanol. Como se deve usá-la em inoculação sequencial com uma *Saccharomyces cerevisiae* compatível para se obter o teor alcoólico adequado, ao se utilizar somente uma levedura não-*Saccharomyces*, há a possibilidade de se obter cervejas com menor quantidade de álcool, porém com as demais características que esta variedade apresenta (Gabbardo, 2020; Zhang *et al.*, 2022; Binati *et al.*, 2023; Canonico *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023).

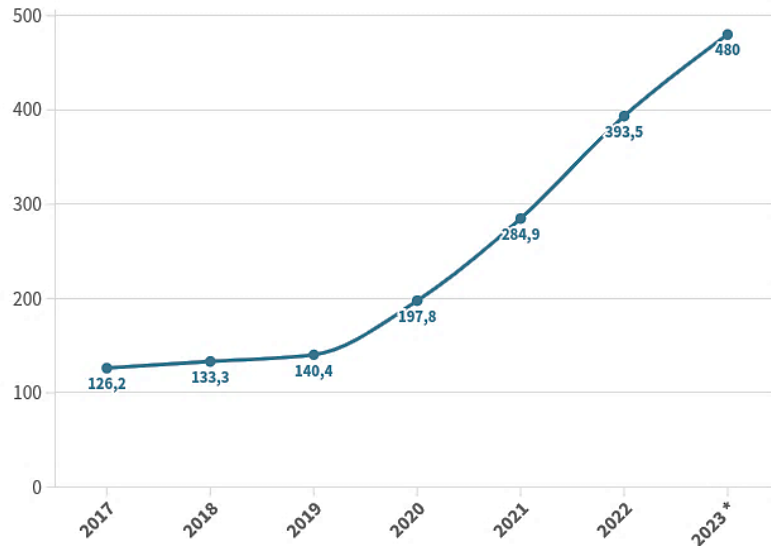
2.7 Tendências de mercado

Cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico tem experimentado um aumento na popularidade nos últimos anos, impulsionadas por diversas tendências de mercado e mudanças nas preferências dos consumidores, que estão optando por bebidas mais saudáveis. Muitas marcas têm investido em estratégias de *marketing* para gerar destaque em seus produtos, com ênfase no sabor, na qualidade e na experiência sensorial, com o objetivo de atrair consumidores que desejam uma alternativa sem álcool, porém mantendo a qualidade e o equilíbrio (Jasovska *et al.*, 2023; Berlinck, 2023; Santiago, 2023; Simonetti, 2023).

Essa demanda pode ser observada em diversas notícias, como traz Berlinck (2023) em reportagem para o portal de notícias g1, onde foi estimado a produção de 500 milhões de litros de cerveja sem álcool no Brasil para o ano de 2023 (**Figura 5**), representando um aumento na produção de 24% em relação aos anos anteriores. Já para a cerveja de teor alcoólico tradicional, o consumo foi de 16,1 bilhões de litros em 2023.

Além disso, há também a fala do presidente executivo do Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (Sindicerv): "A gente vem percebendo uma tendência crescente de opções de uma vida mais equilibrada. Não é sobre restrição, mas como fazer de uma forma mais equilibrada possível" (Berlinck, 2023).

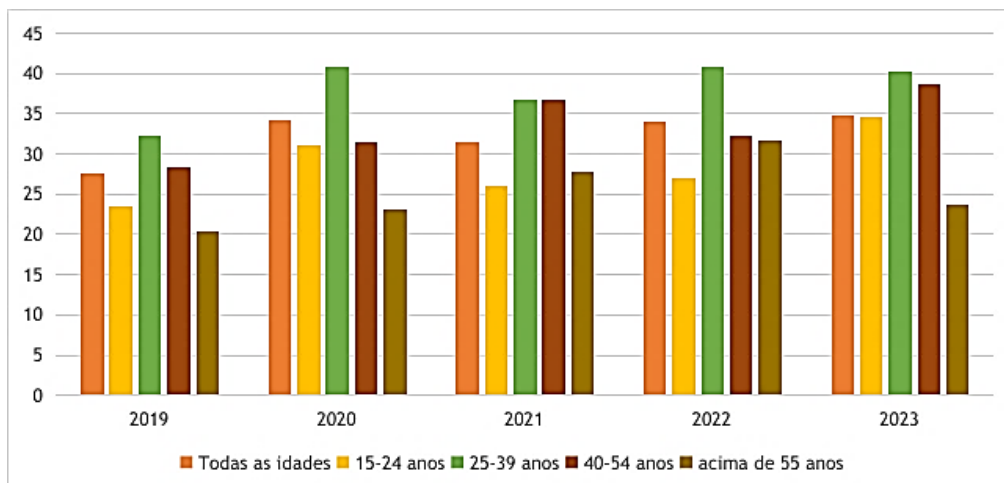
Figura 5. Crescimento no consumo de cerveja sem álcool no Brasil entre os anos de 2017 e 2023.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Santiago (2023) aponta que a cerveja sem álcool está se tornando mais popular entre os mais jovens, pessoas com menos de 30 anos que estão buscando um estilo de vida mais saudável (**Figura 6**). Além disso, relata que o consumo deste tipo de bebida triplicou no Brasil nos últimos quatro anos, e faz a estimativa de que o volume anual produzido chegará a 1 bilhão de litros em 2027.

Figura 6. Percentual de consumidores preocupados em diminuir a ingestão de álcool ao longo dos anos em diferentes faixas etárias.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Porém, a preocupação com o consumo consciente de álcool não deixa de lado a exigência por produtos de qualidade, como demonstra Simonetti (2023) em reportagem para a Forbes. Grandes marcas estão buscando desenvolver cervejas com menores teores alcoólicos, como Heineken e Budweiser, e isso chega também à gastronomia: renomados restaurantes estão preocupados em desenvolver pratos que harmonizam com cervejas e vinhos sem álcool.

Esse grande crescimento para o setor cervejeiro abre espaço para a pesquisa de novas matérias primas e de tecnologias inovadoras no desenvolvimento das cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico, a fim de se oferecer produtos padronizados, seguros e agradáveis aos consumidores cada vez mais interessados e exigentes por esse nicho de mercado.

CAPÍTULO 3: ESTUDO DE BRASSAGEM

3. ESTUDO DE BRASSAGEM

3.1 Experimental

3.1.1 Matérias primas

Para o preparo dos mostos cervejeiros, foram utilizados os maltes Pilsen e Caraamber e água mineral, adquiridos em uma empresa situada em Guarapuava-PR.

3.1.2 Produção do mosto cervejeiro

Nesta pesquisa foi conduzido o estudo da etapa de brassagem apenas, para avaliar seu comportamento ao utilizar a brassagem a frio. Não se deu sequência ao processo cervejeiro com a utilização de lúpulos e realização das etapas de fermentação e maturação, pois esse estudo foi realizado em etapas futuras deste trabalho.

Para se obter o mosto cervejeiro pela técnica de *cold mash*, iniciou-se o processo com a moagem de 200 g de malte pilsen e 10 g de malte caraamber em um triturador manual próprio para grãos, para expor o interior dos grãos de malte. Em seguida, se adicionou 1 litro de água mineral ao malte triturado, dando início ao processo denominado brassagem a frio, utilizando-se tempos e temperaturas previamente determinados (Rosa; Afonso, 2015), e que serão apresentados na **Tabela 3**.

O mosto resultante foi filtrado para a retirada do bagaço de malte, e posteriormente levado para fervura (a aproximadamente 95 °C), durante uma hora. Então, realizou-se nova filtração para eliminação do *trub* quente, constituído principalmente de proteínas desnaturadas (Rosa; Afonso, 2015; BJCP, 2017).

3.1.3 Estudo de otimização

Para avaliar a influência das variáveis temperatura e tempo de brassagem na produção do mosto cervejeiro utilizando a técnica *cold mash*, foi aplicado um planejamento fatorial em dois níveis. Os ensaios do planejamento foram feitos em triplicatas. As variáveis estudadas e os níveis avaliados são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 para otimização da etapa de brassagem no processo produtivo de cervejas de baixo teor alcoólico e sem álcool.

Fatores	Níveis	
	(-)	(+)
Temperatura de brassagem (A)	7°C	9°C
Tempo de brassagem (B)	12 horas	24 horas

Os efeitos dos fatores do planejamento fatorial foram calculados pela **Equação 1**, em que R^+ e R^- são as diferenças das médias dos níveis (+) e (-), respectivamente, dos fatores envolvidos.

$$E_f = (R^+) - (R^-) \quad \text{(Equação 1)}$$

Os efeitos das variáveis nos parâmetros físico-químicos das amostras de mosto foram testados para a significância estatística no nível de 95% de confiança pelo cálculo do erro padrão e pelo gráfico de Pareto utilizando o software Minitab v. 16.2.2 (MINITAB, 2010).

3.1.4 Caracterização físico-química

As amostras de mosto foram analisadas por meio dos parâmetros físico-químicos de teor de sólidos solúveis, pH (método 168/IV) e acidez total (método 221/IV), descrito por American Society of Brewing Chemists (ASBC) (ASBC, 2018). O teor de proteínas do mosto cervejeiro foi determinado com base no método do biureto, descrito por Carvalho e colaboradores (2002).

A cor do mosto cervejeiro foi determinada de acordo com o método 8.3 de *Analytica-EBC*, onde a análise de cor foi feita levando-se em consideração leituras em espectrômetro de UV a 430 nm utilizando cubeta de quartzo, por meio da **Equação 2** (EBC, 2015; Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014).

$$EBC\ Cor = Ab_{430nm} \times 25 \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

Ab é a absorvância em comprimento de onda a 430 nm;

Para a classificação da cor utilizou-se a **Tabela 2**.

3.2 Resultados e Discussão

O estudo da etapa de brassagem do processo cervejeiro, conduzido neste trabalho, foi caracterizado utilizando parâmetros físico-químicos, a fim de se verificar se as amostras seguem valores determinados por legislação e por guias oficiais. Além disso, essas análises foram

importantes para acompanhar as possíveis alterações presentes na brassagem a frio (*cold mash*) em comparação com os dados reportados pela literatura para a brassagem tradicional, a quente.

Para avaliar a influência das variáveis temperatura e tempo na etapa de brassagem, utilizou-se um planejamento fatorial 2². Os efeitos médios calculados do planejamento fatorial 2² são apresentados na **Tabela 4**.

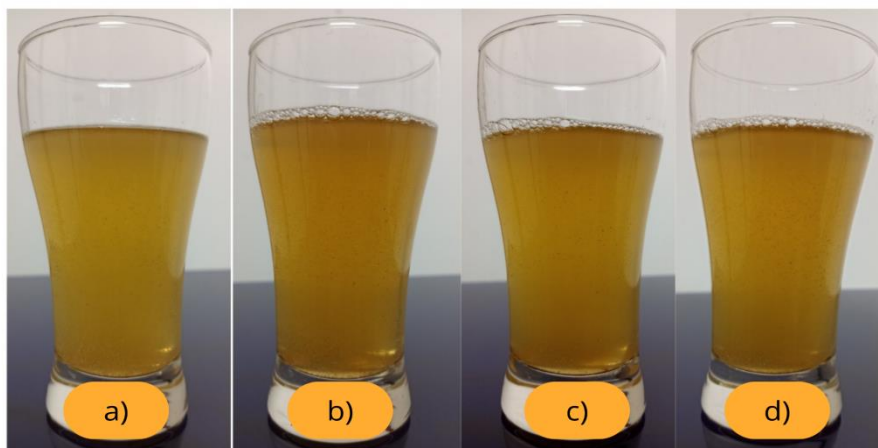
Tabela 4. Efeitos médios calculados e seus erros padrão aplicado na otimização da etapa de brassagem do processo cervejeiro para o planejamento fatorial 2².

Efeitos	Estimativas ± Desvio padrão ^{a,b}				
	Sólidos Solúveis (°Brix)	pH	Acidez Total (mEq/L)	Cor (EBC)	Proteínas Totais
Média Global	6,03 ± 0,03	6,16 ± 0,03	81,30 ± 1,25	11,00 ± 0,40	0,12 ± 0,01
Efeitos Principais					
Temperatura (A)	0,75 ± 0,06	-0,08 ± 0,06	2,50 ± 2,50	1,00 ± 0,80	-0,00 ± 0,02
Tempo (B)	1,05 ± 0,06	0,08 ± 0,06	12,50 ± 2,50	2,50 ± 0,80	0,01 ± 0,02
Efeitos de interação de dois fatores					
A x B	-0,25 ± 0,06	0,08 ± 0,06	-7,50 ± 2,50	-1,00 ± 0,80	-0,00 ± 0,02

^a O erro padrão dos efeitos foi calculado a partir dos desvios padrão. ^b Efeitos maiores que 0,17 para teor de sólidos solúveis e pH; 6,94 para acidez total; 2,22 para cor e 0,02 para teor de proteínas são significativos ao nível de 95% de confiança.

O mosto cervejeiro (**Figura 7**) é composto principalmente por carboidratos, na forma de açúcares fermentáveis e não fermentáveis, que juntamente com outras substâncias minoritárias presentes em solução formam o teor de sólidos solúveis. Dessa forma, este parâmetro possibilita a determinação do valor aproximado de álcool que a cerveja terá no final do processo (Gschaedler, 2017).

Figura 7. Mostos cervejeiros oriundos do estudo de brassagem utilizando a técnica *cold mash*. a) Brassagem a 7 °C por 12 h; b) Brassagem a 7 °C por 24 h; c) Brassagem a 9 °C por 12 h; d) Brassagem a 9 °C por 24 h.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Para uma cerveja tradicional, com cerca de 5% (v/v) de álcool, o valor que deve ser obtido para o teor de sólidos solúveis é de 12 °Bx, aproximadamente (Brasil, 2019). Assim, para se obter cervejas de baixo teor alcoólico (2,5%) ou sem álcool (0,5%), os resultados para essa análise devem se situar próximo de 5 °Bx (Branyik *et al.*, 2012). Os resultados obtidos para teor de sólidos solúveis encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 5. Valores médios para o parâmetro físico-químico de teor de sólidos solúveis e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores		Amostra*	Valores médios ± Desvio padrão ^a
(A)	(B)		Sólidos Solúveis (°Brix)
(-)	(-)	B7-12	5,00 ± 0,00
(+)	(-)	B9-12	6,00 ± 0,00
(-)	(+)	B7-24	6,30 ± 0,14
(+)	(+)	B9-24	6,80 ± 0,00

^a Desvios padrão calculados a partir das duplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *B7: brassagem a 7°C; B9: brassagem a 9°C; 12: tempo de brassagem de 12 horas; 24: tempo de brassagem de 24 horas.

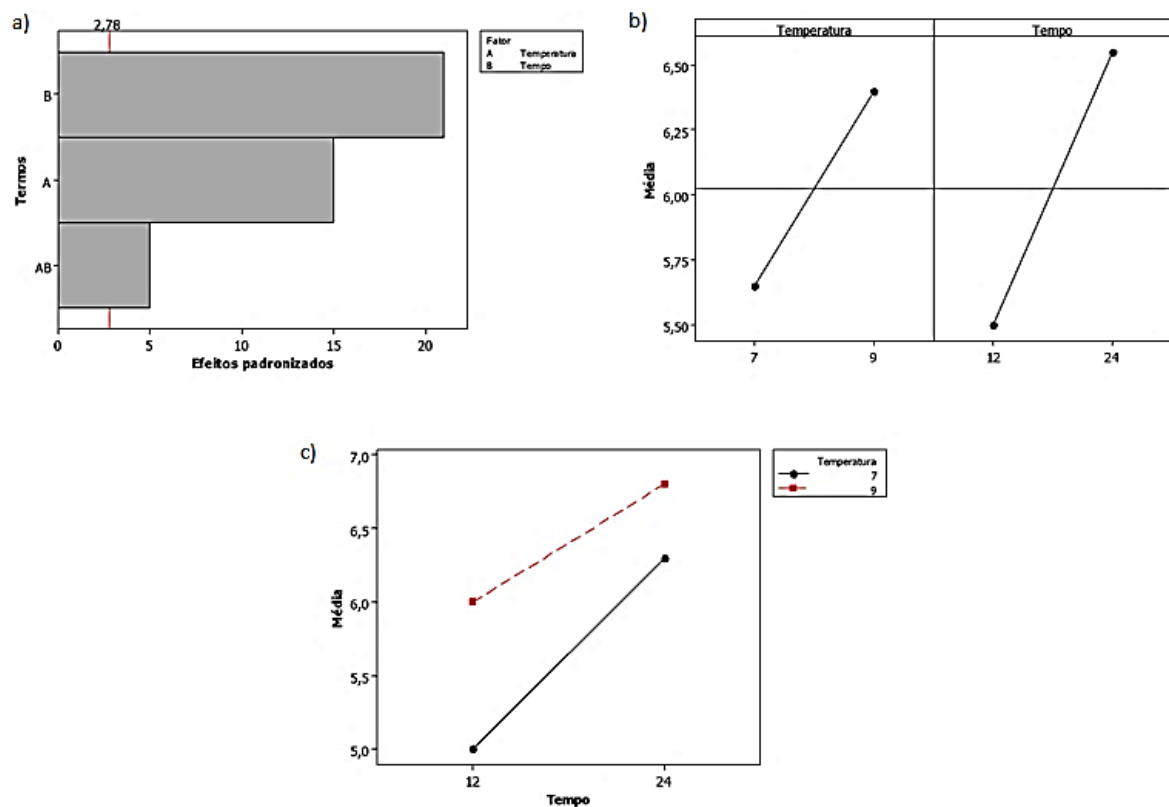
A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança para o teor de sólidos solúveis (**Figura 8 (a e b)**, **Tabela 4**) apontou que todos os fatores estudados são significativos, bem como o efeito de interação entre temperatura e tempo de brassagem (**Figura 8 (c)**), pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Assim, esses fatores não

podem ser analisados separadamente, pois os seus efeitos dependem dos níveis de outras variáveis.

Por meio dos dados obtidos para este parâmetro, se observa que os valores se situaram entre 5,0 e 6,8 °Bx, com a concentração de sólidos solúveis aumentando juntamente com o aumento do tempo de brassagem e da temperatura de brassagem. O teor alcoólico teórico apresenta-se na faixa de 2,8% e 3,8%.

Estudos anteriores utilizando a técnica de brassagem a frio demonstraram que o mosto cervejeiro apresenta quantidade maior de açúcares não fermentáveis e menor de açúcares fermentáveis, sendo o contrário do encontrado para o mosto obtido com brassagem a quente (Dalberto, 2020). Assim, é esperado que o teor alcoólico real, a ser estudado futuramente, seja menor do que o teórico, podendo as cervejas ser classificadas como de baixo teor alcoólico.

Figura 8. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de sólidos solúveis das amostras de mosto (a), gráfico dos efeitos principais significativos tempo e temperatura de brassagem (b) e gráfico do efeito de interação AB (c).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Entre os dois efeitos principais estudados, nota-se que o tempo de brassagem possui maior importância para a análise de teor de sólidos solúveis, pois existe maior amplitude entre os pontos máximo e mínimo (**Figura 8 (b)**), influenciando de maneira sistemática na resposta. Além disso, os dois efeitos principais caracterizam-se como efeitos sinérgicos, uma vez que, ao aumentar o tempo de brassagem de 12 para 24 horas e a temperatura de brassagem de 7 para 9 °C, tem-se o aumento na concentração para o teor de sólidos solúveis.

Os efeitos de interação de dois fatores (**Figura 8 (c)**) indicam que os menores valores de teor de sólidos solúveis, onde se possibilita a obtenção de cervejas com menores quantidades de álcool, são alcançados quando se utiliza o tempo de brassagem de 12 horas e a temperatura de 7°C. Essas variáveis resultam em menor quantidade de açúcares fermentáveis, pois há um menor tempo de exposição para a hidrólise amilácea (Dalberto, 2020), e também uma temperatura amena, onde a ação enzimática não atinge o seu máximo de eficiência (Rosa; Afonso, 2015), resultando em menor teor de álcool após a etapa de fermentação.

Nota-se que mesmo utilizando a maior temperatura para a realização da brassagem, porém associado ao menor tempo, de 12 horas, o valor obtido para a concentração de sólidos solúveis foi de 6,0 °Bx, demonstrando que o tempo é um parâmetro mais importante do que a temperatura para se obter menores teores de álcool.

O controle do pH do mosto cervejeiro é de grande importância, pois a atuação das enzimas responsáveis pela hidrólise amilácea irá depender deste parâmetro (Perim, 2013). Dessa forma, na etapa de brassagem o pH do mosto deve se situar entre 5,4 e 5,8, pois é a faixa onde as enzimas α -amilase e β -amilase apresentam sua maior eficiência, e após a fermentação tende a diminuir e se situar entre valores de 4,0 e 5,0, pois durante esta etapa diversos ácidos orgânicos são formados pelas leveduras, ocasionando essa diminuição (De Francesco *et al*, 2018; Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014; Wyler, 2013). Os resultados obtidos para a determinação de pH do mosto encontram-se na **Tabela 6**.

Tabela 6. Valores médios para o parâmetro físico-químico de pH e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores		Amostra*	Valores médios \pm Desvio padrão ^a
(A)	(B)		pH
(-)	(-)	B7-12	6,20 \pm 0,14
(+)	(-)	B9-12	6,05 \pm 0,00
(-)	(+)	B7-24	6,20 \pm 0,14
(+)	(+)	B9-24	6,20 \pm 0,00

^a Desvios padrão calculados a partir das duplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *B7: brassagem a 7°C; B9: brassagem a 9°C; 12: tempo de brassagem de 12 horas; 24: tempo de brassagem de 24 horas.

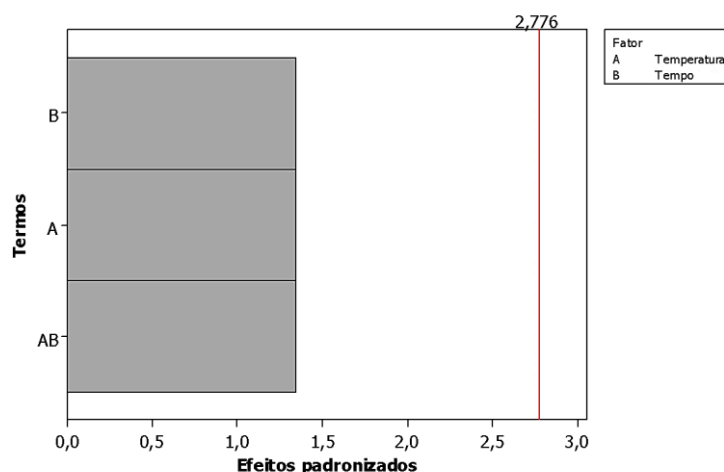
Os valores obtidos para o pH do mosto cervejeiro situaram-se entre 6,05 a 6,20 (**Tabela 6**). Estudos conduzidos por Kutkoski e colaboradores (2019) apresentaram valores de pH entre 5,66 e 6,07, estando esses dados acima do reportado pela literatura para o mosto tradicional (Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014; Kutkoski *et al.*, 2019). Esses valores mais elevados de pH contribuem para extrair compostos indesejáveis da casca do malte, como maiores teores de taninos, que pode impactar na estabilidade coloidal e sensorial da cerveja por meio do aumento da adstringência (Bortoli *et al.*, 2013).

Dentre as enzimas que atuam na etapa de brassagem, a fosfatase é uma das responsáveis pelo abaixamento do pH do mosto, pois realizam a decomposição de fosfatos orgânicos, produzindo ácido fosfórico (Pilarski; Gerogiorgis, 2014; De Francesco *et al.*, 2018; Rosa; Afonso, 2015). Visto que na técnica de *cold mash* não é realizado o aquecimento durante a etapa de brassagem, portanto não há a atuação de cada enzima em sua faixa de temperatura e pH ótimos, esta pode ser uma das causas de valores elevados para o pH do mosto. Este comportamento também pode explicar a menor concentração de açúcares encontrada no mosto quando se utiliza essa técnica, pois a ação das principais enzimas responsáveis pela hidrólise amilácea, que irá resultar nos açúcares fermentáveis, também é modificada (Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014; Wyler, 2013). Deste modo, se faz necessária a correção de pH do mosto antes de se iniciar a brassagem quando se utiliza a técnica de *cold mash*, pois deve-se evitar a extração de compostos indesejáveis que podem ser metabolizados pelas leveduras na etapa de fermentação e convertidos em defeitos da cerveja (*off-flavors*) (Rosa; Afonso, 2015).

Além disso, é possível que o tempo elevado de brassagem resulte em maior extração de compostos fenólicos, provenientes dos grãos de malte, como os ácidos fenólicos e os taninos. Por se tratar de ácidos fracos, os ácidos fenólicos, como o ácido ferúlico e o ácido cafeico, não irão influenciar de maneira significativa no valor de pH. Em relação a características sensoriais, os taninos resultam em sabores adstringentes, que causam a sensação de uma bebida mais seca (Da Silva; Dias; Koblitz, 2021; Quifer-Rada *et al.*, 2015).

A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança para o pH (**Figura 9**) demonstra que nenhum dos fatores estudados, temperatura e tempo de brassagem, são significativos, pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p > 0,05$. Observa-se que não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas (**Tabela 4**). Desta forma, é possível fazer a otimização de cada fator de maneira univariada, pois os efeitos para o parâmetro de pH não dependem dos níveis dos fatores estudados.

Figura 9. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro físico-químico de pH das amostras de mosto.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Os resultados obtidos para a determinação da acidez total encontram-se na **Tabela 7**. Esse parâmetro refere-se aos ácidos orgânicos totais tituláveis na cerveja (Costa *et al*, 2016). Por meio dessa análise pode-se indicar contaminação microbiana na cerveja, pelo excesso de ácido acético, e também é possível se observar valores elevados para a acidez total quando se utiliza apenas malte de cevada, ao invés de se usar adjuntos ou malte de trigo para a produção (Almeida; Belo, 2017). Neste estudo, foi realizada a determinação de acidez total do mosto cervejeiro, sendo pouco observado na literatura dados para esse parâmetro nessa etapa do processo de produção da cerveja.

Tabela 7. Valores médios para o parâmetro físico-químico de acidez total e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2^2 .

Fatores		Valores médios \pm Desvio padrão ^a	
(A)	(B)	Amostra*	Acidez Total (mEq L ⁻¹ de ácido acético)
(-)	(-)	B7-12	70,00 \pm 0,00
(+)	(-)	B9-12	80,00 \pm 0,00
(-)	(+)	B7-24	90,00 \pm 0,00
(+)	(+)	B9-24	85,00 \pm 7,00

^a Desvios padrão calculados a partir das duplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *B7: brassagem a 7°C; B9: brassagem a 9°C; 12: tempo de brassagem de 12 horas; 24: tempo de brassagem de 24 horas.

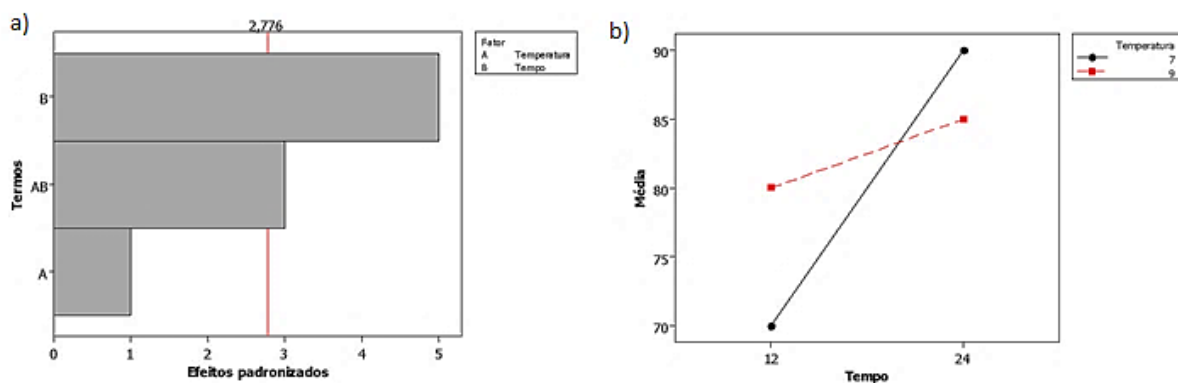
Entre as amostras deste estudo, observa-se um aumento nos valores de acidez total quando se aumenta a temperatura de brassagem, de 7 para 9°C, bem como quando o tempo de

brassagem é aumentado, de 12 para 24 horas. Os dados obtidos para o mosto variaram entre 70,00 e 90,00 mEq L⁻¹, enquanto Kutkoski e colaboradores (2019) obtiveram um valor máximo para a acidez de 24,60 mEq L⁻¹ utilizando a brassagem a quente, indicando que as diferentes técnicas de brassagem, a frio e a quente, influenciaram neste parâmetro.

Os valores de acidez elevados obtidos no presente estudo podem ser decorrentes de uma maior extração de compostos fenólicos ácidos, propiciado pelo maior tempo de contato entre o malte e a água nesta etapa (Carvalho; Guido, 2022). Como os valores de acidez total tendem a diminuir após a etapa de fermentação, é possível se obter resultados próximos aos reportados pela literatura para a cerveja finalizada (Kutkoski *et al*, 2019).

A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de confiança para a acidez total (**Figura 10, Tabela 4**) apontou que o fator tempo de brassagem é significativo, bem como o efeito de interação entre temperatura e tempo, pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$.

Figura 10. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro físico-químico de acidez total das amostras de mosto cervejeiro (a) e gráfico do efeito de interação entre temperatura de brassagem e tempo de brassagem (b).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

O gráfico para o efeito de interação de dois fatores (**Figura 10 (b)**) entre temperatura e tempo demonstra que o maior valor de acidez total é obtido quando se realiza a brassagem a 7°C e pelo tempo de 24 horas, e o menor valor, a 7°C e 12 horas. Assim, se observa que o fator tempo de brassagem exerce grande influência neste parâmetro, devendo-se levar em consideração os dados a serem obtidos após a etapa de fermentação, que será realizada

futuramente, para ser possível optar pela condição mais adequada a fim de se obter cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico equilibradas sensorialmente em referência a acidez total.

O parâmetro de cor das cervejas se mostra importante para a composição do aspecto físico da bebida, e é determinado utilizando como padrão a escala de unidades EBC (*European Brewery Convention*) (ASBC, 2018).

Neste estudo, utilizou-se o mesmo método para determinar a cor dos mostos cervejeiros, onde o resultado proveria uma aproximação adequada para a cor da cerveja finalizada, pois o processo de fermentação resulta em uma pequena diminuição na coloração (Buglass, 2011). Assim, buscou-se a obtenção de valores de cor maiores para o mosto, em comparação aos valores normalmente obtidos para cervejas do estilo pilsen, para garantir que o produto final tenha a coloração adequada. Os resultados obtidos para a determinação da cor encontram-se na **Tabela 8**.

O valor para a coloração da amostra B7-12, de 9 EBC, corresponde a cor amarela, e para as amostras B9-12, B7-24, B9-24, que resultaram em 11 e 12 EBC, correspondem a cor dourada, de acordo com a **Tabela 2** (Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014).

Tabela 8. Valores médios para o parâmetro físico-químico de cor e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores		Valores médios ± Desvio padrão ^a	
(A)	(B)	Amostra*	Cor (EBC)
(-)	(-)	B7-12	9,00 ± 0,70
(+)	(-)	B9-12	11,00 ± 0,70
(-)	(+)	B7-24	12,00 ± 1,40
(+)	(+)	B9-24	12,00 ± 1,40

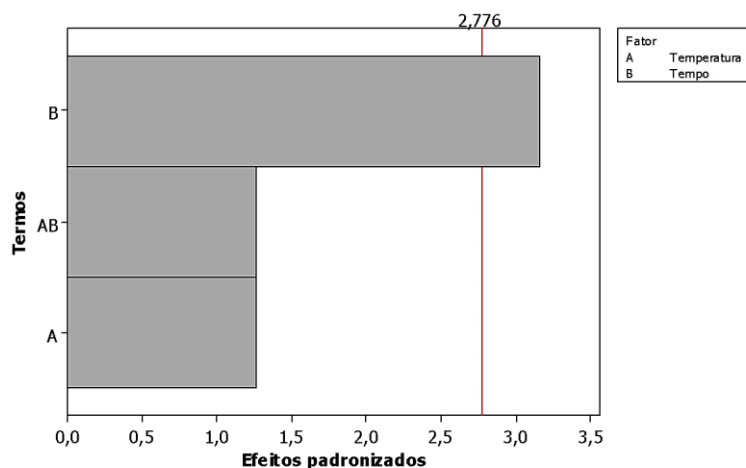
^a Desvios padrão calculados a partir das duplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *B7: brassagem a 7°C; B9: brassagem a 9°C; 12: tempo de brassagem de 12 horas; 24: tempo de brassagem de 24 horas.

A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança para o parâmetro cor (**Figura 11**) apontou que o fator principal tempo de brassagem é significativo, pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Observa-se que não houve um efeito de interação significativo entre as duas variáveis estudadas na avaliação da cor dos mostos cervejeiros (**Tabela 4**).

Dessa forma, é possível observar que a cor dos mostos tem um aumento em seu valor quando se aumenta o tempo de brassagem, de 12 para 24 horas. Isso acontece porque a cor está relacionada ao malte (Rosa; Afonso, 2015), que na brassagem está presente desde o início do

processo, portanto, o tempo de 24 horas permite uma maior extração de coloração, e também de sabores, para o mosto.

Figura 11. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro físico-químico de cor das amostras de mosto.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Além do malte, também ocorre uma intensificação da cor durante a etapa de fervura do mosto, pois se propicia a ocorrência da reação de Maillard, que ocorre entre uma proteína ou um aminoácido e um açúcar redutor, como a glicose e a maltose, resultando na formação de compostos de coloração marrom chamados melanoidinas (Buglass, 2011).

Assim, a fim de se obter um mosto cervejeiro com maior valor para o parâmetro cor, que, conseqüentemente, também terá uma maior concentração de sabores maltados, pode-se determinar o tempo de brassagem de 24 horas para a formulação da cerveja final.

Estudos conduzidos por Kutkoski e colaboradores (2019) para a coloração de cervejas em fase de maturação demonstrou resultados entre 5 e 8 EBC. Já neste estudo foram obtidas colorações entre 9 e 12 EBC para o mosto cervejeiro. Não se pode realizar a comparação entre o mosto com a cerveja em processo de maturação, pois sabe-se que a cor decresce em aproximadamente 2 unidades após a etapa de fermentação, porém, fazendo-se uma análise é possível notar que as cervejas obtidas por Cold Mash poderão apresentar coloração entre 7 e 10 EBC, evidenciado o ganho de coloração que esse novo processo de brassagem irá conferir para a cerveja finalizada (Dalberto *et al.*, 2021; Kutkoski *et al.*, 2019).

As proteínas presentes no mosto e na cerveja tem origem principalmente nos grãos de malte, e são compostas por aminoácidos. Grande parte das proteínas são precipitadas e

eliminadas durante as etapas de brassagem, fervura e resfriamento pós fervura. Além disso, uma parte é utilizada pelas leveduras durante o processo de fermentação, e o residual de proteínas e aminoácidos que permanece na cerveja finalizada contribui para o corpo da bebida e a retenção de espuma, além de sabores característicos para determinados estilos cervejeiros (Buglass, 2011). Os resultados obtidos para a determinação do teor de proteínas encontram-se na **Tabela 9**.

Tabela 9. Valores médios para o teor de proteínas e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores		Amostra*	Valores médios ± Desvio padrão ^a
(A)	(B)		Proteínas (% (m/v))
(-)	(-)	B7-12	0,12 ± 0,00
(+)	(-)	B9-12	0,12 ± 0,00
(-)	(+)	B7-24	0,13 ± 0,01
(+)	(+)	B9-24	0,13 ± 0,01

^a Desvios padrão calculados a partir das duplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *B7: brassagem a 7°C; B9: brassagem a 9°C; 12: tempo de brassagem de 12 horas; 24: tempo de brassagem de 24 horas.

Os dados obtidos para o teor de proteínas neste estudo situaram-se entre 0,12 e 0,13%, sendo estes valores menores do que os apresentados por Brunelli e Venturini Filho (2013) para cervejas preparadas com adição de mel, onde se obteve teores de proteínas entre 0,38 e 0,79%. A ausência de aquecimento durante a etapa de brassagem pode ser a explicação para a baixa concentração de proteínas do mosto, pois a temperatura contribui para sua extração dos grãos de malte e sua quebra para unidades menores, pela ativação das enzimas (Kerr; Caboche; Schulz, 2019; Niu *et al.*, 2018).

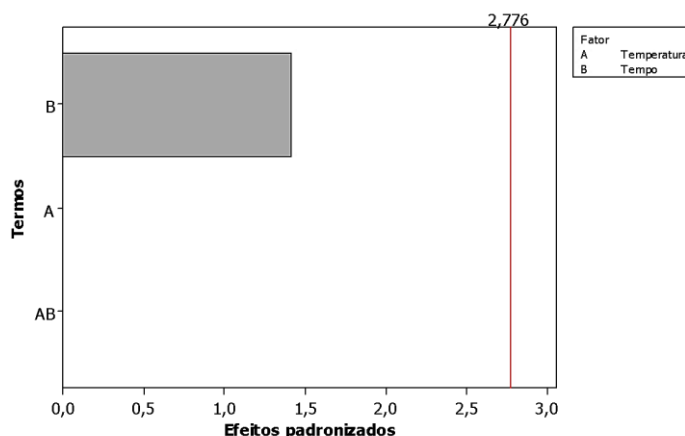
Estudos conduzidos por Da Silva (2005) para a determinação de proteínas no malte, mosto cervejeiro e cerveja demonstram que há um decaimento significativo nos valores entre o mosto e a cerveja, demonstrando que parte do conteúdo proteico é eliminado após as etapas de fermentação e maturação. Dessa forma, há a tendência que os dados obtidos neste estudo para proteínas apresentem-se ainda menores para a cerveja finalizada.

A importância de se obter valores baixos para o teor de proteínas reside na possibilidade de se analisar a concentração de glúten nessas cervejas, que poderá ser baixa o suficiente para ser caracterizada como cerveja sem glúten, ou seja, abaixo de 20 ppm (Cela *et al.*, 2022), abrindo espaço para se atingir diferentes consumidores.

A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança para o teor de proteínas (**Figura 12**) demonstra que nenhum dos fatores estudados, temperatura e tempo de

brassagem, são significativos, pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p > 0,05$. Observa-se que não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas (Tabela 4).

Figura 12. Gráfico de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao parâmetro de teor de proteínas das amostras de mosto.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Desta forma, é possível fazer a otimização de cada fator de maneira univariada, pois os efeitos para a concentração de proteínas não dependem dos níveis dos fatores estudados.

3.3 Conclusões parciais

O estudo de brassagem demonstrou que a utilização da técnica de *cold mash* foi adequada para se atingir uma menor concentração de carboidratos (teor de sólidos solúveis) para o mosto cervejeiro, e isso poderá possibilitar a obtenção de cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico na sequência desta pesquisa. Isso evidencia a inovação presente nesta técnica de brassagem e as vantagens em utilizá-la quando se deseja obter essas características.

A aplicação de um planejamento fatorial 2^2 permitiu a constatação de que o tempo de brassagem foi um fator mais importante do que a temperatura, influenciando sistematicamente nos parâmetros físico-químicos de teor de sólidos solúveis, acidez total e cor das amostras de mosto. Dentre estes parâmetros, apenas para a análise de cor se obteve resultados semelhantes aos de cervejas tradicionais. O pH e a acidez total apresentaram valores acima dos reportados na literatura para o mosto cervejeiro, podendo ser uma característica própria da técnica de *cold mash*. Para o teor de proteínas, os dados obtidos se situaram abaixo do encontrado para mostos tradicionais.

Desta forma, visando uma atenção quanto aos aspectos sensoriais das posteriores amostras de cervejas, as condições em que o tempo de brassagem é maior, de 24 horas, podem se mostrar mais adequadas, pois tem-se uma maior intensidade de cor e de sabores e aromas maltados, devido ao maior tempo de extração dessas características do malte.

CAPÍTULO 4: ESTUDO DE FERMENTAÇÃO

4. ESTUDO DE FERMENTAÇÃO

4.1 Experimental

4.1.1 Matérias primas

Para o preparo das cervejas foram utilizados os maltes tipo Pilsen e Caraamber. Os lúpulos usados foram o *Hallertau Tradition*, que possui de 4,0 a 10,0% de α -ácidos, e o *Hallertau Magnum*, com teor de 11,0 a 16,0% em α -ácidos, ambos da marca HVG.

Para as amostras sem álcool, duas variedades de levedura especiais foram utilizadas: *Torulaspora delbrueckii* (Biodiva TD291, Lallemand, liofilizada) e *Metschnikowia pulcherrima* (Flavia MP346, Lallemand, liofilizada). Para as amostras de baixo teor alcoólico, utilizou-se a levedura *Torulaspora delbrueckii* em associação com a levedura de baixa fermentação *Saccharomyces cerevisiae* (Diamond 3070, Lallemand, liofilizada). Além disso, utilizou-se para a nutrição das leveduras um enriquecedor de nutrientes essenciais para a fermentação alcoólica (*Servomyces* L50-D50, Lallemand, liofilizado).

4.1.2 Preparo das amostras de cerveja

Para se obter o mosto cervejeiro pela técnica de *cold mash*, iniciou-se o processo com a moagem de 200 g/L de malte pilsen e 10 g/L de malte caraamber em um triturador manual próprio para grãos, para expor o interior dos grãos de malte. Em seguida, se adicionou a água mineral ao malte triturado, dando início ao processo denominado brassagem a frio, utilizando-se o tempo de 24 horas e a temperatura de 7°C (Rosa; Afonso, 2015; Dalberto *et al.*, 2021).

O mosto resultante foi filtrado para a retirada do bagaço de malte, e posteriormente levado para fervura (a aproximadamente 96°C), durante uma hora. Então, realizou-se nova filtração para eliminação do *trub* quente, constituído principalmente por proteínas desnaturadas e pelos resíduos dos lúpulos utilizados (Rosa; Afonso, 2015; BJCP, 2017). Para a etapa de fermentação utilizou-se diferentes tipos de leveduras e nutrição das leveduras, e as condições experimentais foram apresentadas na **Tabela 10**.

4.1.3 Estudo de otimização

Para a cerveja sem álcool, avaliou-se a influência das variáveis tipo de levedura não-*Saccharomyces* e nutrição da levedura, aplicando-se um planejamento fatorial em dois níveis.

Os ensaios do planejamento foram feitos em triplicatas. As variáveis estudadas e os níveis avaliados são apresentados na **Tabela 10**.

Tabela 10. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 para a otimização do processo produtivo de cervejas sem álcool.

Fatores	Níveis	
	(-)	(+)
Tipo de levedura não- <i>Saccharomyces</i> (A)	<i>Torulaspóra delbrueckii</i>	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
Nutrição da levedura (B)	Sem	Com

Para a cerveja de baixo teor alcoólico, avaliou-se a influência das variáveis proporção de levedura não-*Saccharomyces* (A) e nutrição da levedura (B), aplicando-se um planejamento fatorial em dois níveis. Os ensaios do planejamento foram feitos em triplicatas. As variáveis estudadas e os níveis avaliados são apresentados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Fatores e níveis do planejamento fatorial 2^2 para a otimização do processo produtivo de cervejas de baixo teor alcoólico.

Fatores	Níveis	
	(-)	(+)
Proporção de levedura não- <i>Saccharomyces</i> (A) (<i>T. delbrueckii</i> : <i>S. cerevisiae</i>)	6:4	8:2
Nutrição da levedura (B)	Sem	Com

Os efeitos dos fatores do planejamento fatorial foram calculados pela **Equação 4**, em que são as diferenças das médias dos níveis (+) e (-), respectivamente, dos fatores envolvidos.

$$E_f = (R^+) - (R^-) \quad \text{(Equação 4)}$$

Os efeitos das variáveis no perfil mineral, físico-químico e atividade antioxidante das cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico foram testados para a significância estatística no nível de 95% de confiança pelo cálculo do erro padrão e pelo gráfico de Pareto utilizando o software Minitab v. 16.2.2 (MINITAB, 2010).

4.1.4 Caracterização físico-química

As amostras de cerveja foram analisadas por meio dos parâmetros físico-químicos de teor de sólidos solúveis, pH (método 168/IV) e acidez total (método 221/IV). O teor alcoólico foi determinado usando os métodos internacionais propostos por American Society of Brewing Chemists (ASBC). O grau alcoólico (% (v/v)) foi obtido pela tabela de conversão de densidade relativa (Zenebon; Pascuet; Tiglea, 2008; ASBC, 2018). O teor de proteínas foi determinado com base no método de Bradford, descrito por Carvalho e colaboradores (2002).

A cor das amostras cervejeiras foi determinada de acordo com o método 8.3 de *Analytica-EBC*, onde a análise de cor foi feita levando-se em consideração leituras em espectrômetro de UV a 430 nm utilizando cubeta de quartzo, por meio da **Equação 5** (Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014; EBC, 2015).

$$EBC\ Cor = A_{430nm} \times 25 \quad \text{(Equação 5)}$$

Onde:

A é a absorbância em comprimento de onda de 430 nm;

Para determinar o amargor foi empregado o método 8.8 de *Analytica – EBC*, recomendado pelo *European Brewery Convention*. O amargor das amostras é expresso em unidades de amargor (IBU) (Brunelli; Mansano; Venturini Filho, 2014; EBC, 2015).

4.1.5 Perfil Mineral

As determinações de Zn, K, Mn, Ca e Mg foram feitas em Espectrômetro de Absorção Atômica em Chama (FAAS), utilizando lâmpadas de cátodo oco (Varian AA-220 e Photron). A curva de calibração para os metais analisados foi construída nas concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 mg L⁻¹. As determinações de K foram feitas no mesmo instrumento utilizando o modo de Espectrômetro de Emissão Atômica em Chama (FAES), de acordo com Niemes (2018).

4.1.6 Atividade Antioxidante

Foi determinada a atividade antioxidante das amostras sobre o radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico (ABTS) utilizando o método descrito por Carvalho (2011).

As análises tiveram seus resultados determinados pela **Equação 6**.

$$\% \text{ de inibição} = \frac{Ac - Aa}{Ac} \times 100 \quad \text{(Equação 6)}$$

Onde:

Ac é a absorbância do controle;

Aa é a absorbância da amostra;

4.1.7 Teor de Fenólicos

Os teores de fenólicos totais foram determinados através de espectrofotometria no UV-Visível utilizando o reagente Follin-Ciocalteau, conforme metodologia descrita por Kolc (2014). Para a quantificação foram construídas curvas analíticas em faixas de concentração diferentes do padrão analítico, apresentando ajuste ao modelo linear descrito pela **Equação 7**. Para a análise quantitativa a curva analítica foi construída em 10 níveis de concentração de ácido gálico (40, 80, 120, 160, 200, 240, 280, 320, 360 e 400 mg/L) (Kolc, 2014).

$$Abs = -0,00899 \pm 0,00396 + 7,573 \times 10^{-4} \pm 2,239 \times 10^{-5} \quad \text{(Equação 7)}$$

4.2 Cerveja sem álcool

4.2.1 Resultados e Discussão

O estudo conduzido nesta pesquisa investigou a aplicação da técnica de brassagem *cold mash* em conjunto com o uso de leveduras especiais no processo cervejeiro, visando avaliar a conformidade das amostras com os valores estabelecidos pela legislação brasileira e guias oficiais. Além disso, buscou-se acompanhar as possíveis alterações que a brassagem a frio (*cold mash*) pode acarretar quando associada a diferentes condições de fermentação, em comparação com os dados reportados pela literatura para a brassagem tradicional, a quente, com rampas de temperatura, e para a utilização de leveduras cervejeiras convencionais.

As leveduras utilizadas, *Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*, conhecidas comercialmente como Biodiva e Flavia (Lallemand Inc.®), respectivamente, são denominadas leveduras especiais não-*Saccharomyces*. Elas são tradicionalmente utilizadas na fermentação de vinhos, por resultarem predominantemente em compostos aromáticos. Assim, a produção de etanol por essas leveduras é mínima, e por isso, elas são comumente usadas em associação a uma levedura *Saccharomyces* compatível (Canónico *et al.*, 2021; Johansson *et al.*, 2021).

Estudos reportados por Johansson *et al.* (2021) e por Pereira-Junior (2019) já demonstraram a utilização dessas leveduras para a produção de cerveja, obtendo-se menores teores de álcool, em torno de 1,0 e 2,3%, respectivamente, classificando-as, assim, em cervejas de baixo teor alcoólico. No presente estudo, buscou-se associar duas leveduras não-*Saccharomyces* à técnica *Cold Mash*, visando a obtenção de quantidades ainda menores de álcool.

O primeiro parâmetro físico-químico avaliado foi o de teor de sólidos solúveis, que se refere a quantidade de substâncias sólidas dissolvidas no mosto cervejeiro. Entre essas substâncias estão os açúcares fermentáveis e não fermentáveis, e, em menores concentrações, proteínas, minerais, e até mesmo alguns compostos orgânicos ácidos. Por meio dessa análise pode-se estimar o teor alcoólico teórico que a cerveja irá apresentar, além de exercer influência em aspectos sensoriais, como a percepção do corpo da cerveja (Vrzal *et al.*, 2023; Osorio *et al.*, 2024).

Para avaliar a influência das variáveis tipo de levedura especial e nutrição da levedura na etapa de fermentação, utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 . Assim, a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança para o parâmetro de sólidos solúveis demonstra que nenhum dos fatores estudados, tipo de levedura especial e nutrição da levedura, são significativos, pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p > 0,05$. Observa-se que não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas. Desta forma, é possível fazer a otimização de cada fator de maneira univariada, pois os efeitos para o parâmetro de sólidos solúveis não dependem dos níveis dos fatores estudados.

Isso acontece porque as variáveis deste estudo encontram-se na etapa de fermentação do processo cervejeiro, e o teor de sólidos solúveis é o parâmetro obtido pela análise do mosto cervejeiro, sendo essa uma das etapas iniciais do processo. O mosto é composto principalmente

por carboidratos, na forma de açúcares fermentáveis e não fermentáveis, juntamente com outras substâncias minoritárias presentes em solução (Vrzal *et al.*, 2023). Desta forma, todas as amostras deste estudo foram preparadas utilizando a técnica de *Cold Mash*, não havendo diferenças para a obtenção deste parâmetro, como pode ser observado na **Tabela 12**.

Tabela 12. Valores médios para os parâmetros físico-químicos e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2² para as amostras de cerveja.

Fatores			Valores médios ± Desvio padrão ^a					
(A)	(B)	Amostra*	Sólidos solúveis (°Brix)	Teor alcoólico (%)	pH	Acidez total (mEq/L)	Cor (EBC)	Amargor (IBU)
(-)	(-)	Td	5,20 ± 0,20	0,13 ± 0,06	5,10 ± 0,10	36,00 ± 3,43	8,0 ± 0,5	14,8 ± 0,9
(+)	(-)	Mp	5,20 ± 0,20	0,00 ± 0,00	5,40 ± 0,12	32,00 ± 2,00	9,0 ± 0,1	14,8 ± 1,2
(-)	(+)	TdS	5,20 ± 0,20	0,43 ± 0,06	5,20 ± 0,10	36,00 ± 3,43	8,0 ± 0,5	14,1 ± 0,6
(+)	(+)	MpS	5,20 ± 0,20	0,07 ± 0,06	5,40 ± 0,06	32,70 ± 1,15	8,0 ± 0,1	13,6 ± 0,4

^aDesvios padrão calculados a partir das triplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *Td: levedura *Torulaspora delbrueckii*; Mp: levedura *Metschnikowia pulcherrima*; S: nutrição com *Servomyces*.

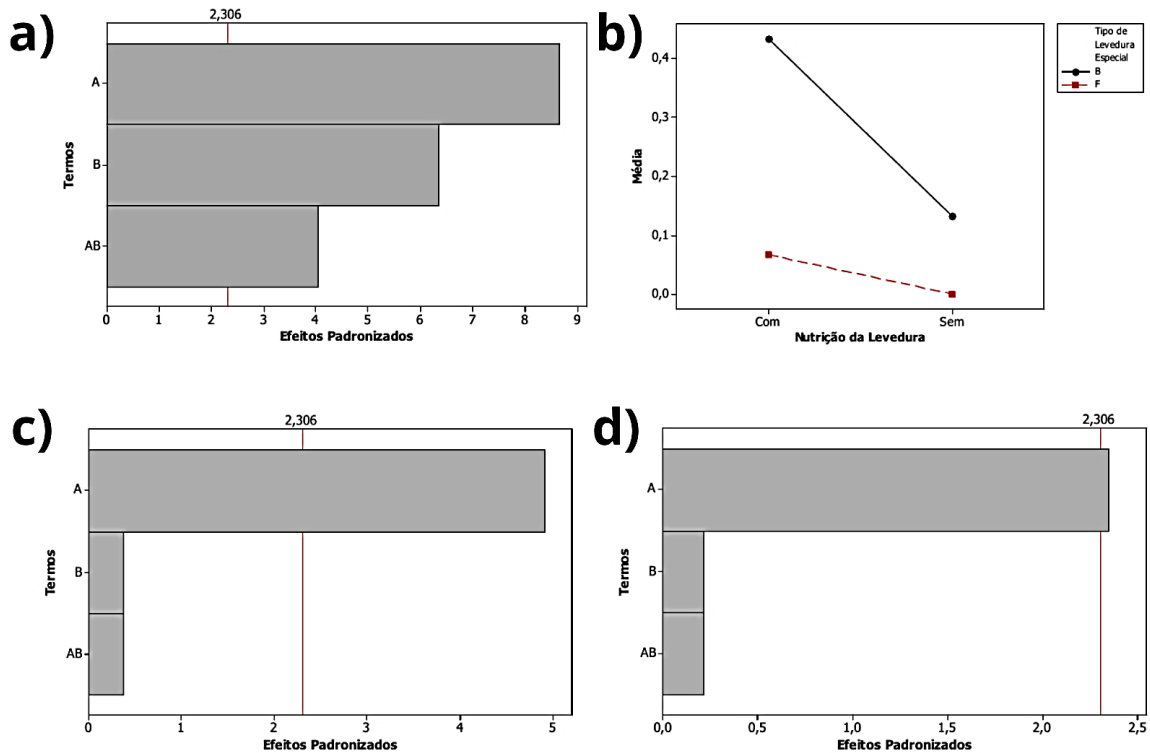
O mosto cervejeiro de uma cerveja tradicional possui, em média, um valor de 10 a 12°Bx, para que se possa obter ao final do processo uma quantidade de álcool de aproximadamente 5% (v/v) (Brasil, 2019). Quando se utiliza a técnica de *Cold Mash*, esse valor decai, como é possível notar neste estudo, pois as enzimas responsáveis pela hidrólise do amido não estão atuando em seu máximo de eficiência, ao se comparar com a brassagem a quente, extraindo, desta forma, uma quantidade menor de açúcares fermentáveis (Dalberto *et al.*, 2021;

Dalberto; Niemes; Da Rosa, 2023). Essa menor extração irá possibilitar a obtenção de menor teor de álcool para a cerveja (Branyik *et al.*, 2012).

Outro parâmetro de grande importância quando se trata de cervejas é o teor alcoólico. Os resultados obtidos para a determinação do teor alcoólico encontram-se na **Tabela 12**. A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança (**Figura 13 (a)**) apontou que todos os fatores estudados são significativos, bem como o efeito de interação entre temperatura e tempo de brassagem (**Figura 13 (b)**), pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Assim, esses fatores não podem ser analisados separadamente, pois os seus efeitos dependem dos níveis de outras variáveis.

Assim, se observa que as amostras se classificam como cerveja sem álcool de acordo com a legislação brasileira (até 0,5% (v/v)). Isso pode ser explicado pela diferença de metabolismo entre as leveduras, onde ambas possuem como característica a conversão prioritária de açúcares em outros compostos de aroma e de sabor, especialmente os ésteres, ao invés do etanol, como ocorre para leveduras cervejeiras tradicionais. Isso é decorrente da presença de enzimas específicas, como as esterases e as glicosidases, que propiciam a formação desses compostos em maiores quantidades (Canónico *et al.*, 2021; Johansson *et al.*, 2021).

Figura 13. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor alcoólico (a), pH (c) e acidez total (d) das amostras de cerveja. Gráfico do efeito de interação entre tipo de levedura não-Saccharomyces e nutrição de levedura aplicado ao parâmetro de teor alcoólico (c).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Ao se utilizar a levedura especial *Metschnikowia pulcherrima*, observou-se que foi obtido quantidades menores de álcool em comparação ao uso da levedura especial *Torulaspora delbrueckii*. Isso pode ser benéfico, pois a maioria dos países não possuem tolerância quanto ao teor alcoólico para uma cerveja ser classificada como sem álcool, como ocorre no Brasil (Branyik *et al.*, 2012).

Além disso, nota-se um aumento na quantidade de álcool quando se promove a nutrição das leveduras, pela adição de uma cepa enriquecida com minerais, pois esse enriquecimento propicia a condução de uma fermentação com mais eficiência e com menor tendência de se formar compostos indesejáveis, os chamados *off-flavors*, podendo contribuir para um melhor perfil sensorial do produto ao mesmo tempo em que se mantém as cervejas na classificação sem álcool (Gama *et al.*, 2017; Leão *et al.*, 2018).

Os efeitos de interação de dois fatores (**Figura 13 (b)**) indicam que o menor valor para teor alcoólico é obtido ao utilizar a levedura *M. pulcherrima* sem a nutrição adicional, bem como o maior valor ao associar a levedura *T. delbrueckii* com a nutrição, e isso se deve às diferenças metabólicas entre as duas leveduras, com menor predominância de formação de álcool para a levedura *M. pulcherrima*, e a uma menor ou maior eficiência fermentativa, com a ausência ou presença do enriquecimento nutricional.

A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança para os parâmetros de pH e acidez total (**Figura 13 (c) e (d)**) apontou que o fator tipo de levedura especial é significativo, pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas. Assim, esse fator não pode ser analisado separadamente, pois os seus efeitos dependem dos níveis de outras variáveis.

As diferenças observadas para pH e acidez total são determinadas pelas diferentes vias metabólicas de cada uma das duas leveduras utilizadas, onde a levedura *Torulaspora delbrueckii* tende a produzir uma maior quantidade de ácidos orgânicos em comparação com a levedura *Metschnikowia pulcherrima*. Além disso, a espécie *M. pulcherrima* apresenta maior produção de ácidos graxos, álcoois superiores, ésteres, terpenos e glicerol, resultando em valores de acidez titulável mais baixos comparativamente, como é demonstrado por Gabbardo (2020) em análises de diversas classes de compostos para essas duas leveduras na fermentação de vinhos.

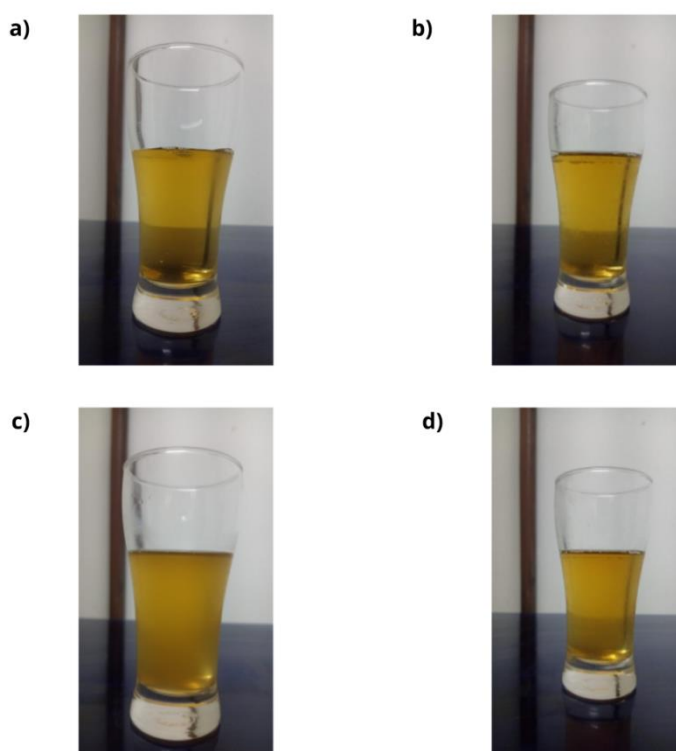
Além disso, se observa diferenças nos valores de acidez ao se comparar o mosto (70 a 90 mEq/L) com a cerveja finalizada (32 a 36 mEq/L) nesta pesquisa. Estudos conduzidos por Gonçalves e colaboradores (2022) explicam que durante a etapa de fermentação as leveduras podem realizar um processo denominado biossorção dos compostos fenólicos, resultando na diminuição da concentração dessa classe de compostos, e por consequência, diminuindo os valores de acidez total da cerveja (Silva, 2013; Gonçalves *et al.*, 2022).

Todos os valores obtidos para as amostras em relação à acidez total mostram-se próximos ao reportado pela literatura, como foi descrito por Sousa e Fogaça (2019), com valores entre 27,0 e 38,7 mEq/L, e por Kutkoski e colaboradores (2019), com dados em torno de 24,6 mEq/L. Assim, esse parâmetro encontra-se adequado para a obtenção de produtos padronizados e sensorialmente agradáveis.

Para o amargor e a cor das cervejas, duas importantes características sensoriais, a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança demonstra que nenhum dos fatores estudados são significativos, pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p > 0,05$. Não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas, portanto, pode-se fazer a otimização de cada fator de maneira univariada, pois os efeitos não dependem dos níveis dos fatores avaliados.

Para o estilo *Standard American Lager*, uma derivação do estilo Pilsen, de acordo com guias cervejeiros oficiais, como o *Beer Judge Certification Program* (BJCP, 2021), a cor da cerveja deve se situar entre 4 e 8 EBC, e o amargor entre 8 e 18 IBU, desta forma, se observa que as amostras deste estudo se encontram adequadas para o estilo proposto, possibilitando semelhanças com cervejas tradicionais (**Figura 14**).

Figura 14. Cervejas sem álcool produzidas pela técnica de *cold mash* utilizando: a) levedura *Torulaspora delbrueckii* b) levedura *Torulaspora delbrueckii* utilizando nutrição com *Servomyces*; c) levedura *Metschnikowia pulcherrima*; d) levedura *Metschnikowia pulcherrima* utilizando nutrição com *Servomyces*.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Além dos parâmetros físico-químicos descritos, os compostos fenólicos presentes na cerveja também irão influenciar nas características sensoriais e na qualidade geral da bebida, contribuindo em características como sabor, aroma e aparência. A interação entre diferentes tipos de fenólicos também apresenta influência na percepção do amargor e na formação da espuma. Assim, a determinação desses compostos é importante para a produção de cervejas que atendam aos padrões de qualidade (Petrón *et al.*, 2021; Carvalho; Guido, 2022).

Dentre os compostos fenólicos encontrados na cerveja, 70% a 80% têm sua origem no malte, enquanto 20% a 30% provêm dos lúpulos e outros ingredientes (Quifer-Rada *et al.*, 2015). Dentre esses compostos destacam-se os ácidos fenólicos, flavonóides, flavonas, e taninos hidrolisáveis, incluindo as proantocianidinas (Coulibaly *et al.*, 2023). A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos e dos flavonóides exercem influências na qualidade sensorial da cerveja, atuando para retardar as mudanças no sabor e aroma durante o período de armazenamento (Wannenmacher *et al.*, 2018).

No processo de produção da cerveja ocorrem reações químicas que influenciam a composição de compostos fenólicos. A etapa de brassagem é uma das responsáveis por aumentar a concentração desses compostos, bem como pelo aumento da atividade antioxidante (Carvalho; Guido, 2022). Desta forma, observa-se neste estudo teores de compostos fenólicos entre 94 e 134 mg/L, aproximadamente, que são apresentados na **Tabela 13**.

Moura-Nunes e colaboradores (2016) avaliaram o teor de compostos fenólicos de cervejas brasileiras, para amostras de cerveja sem álcool e amostras do estilo American Standard Lager, reportando valores inferiores aos obtidos no presente estudo. Essa diferença pode ser explicada pelo emprego da técnica *Cold Mash*, onde existe maior tempo de extração desses compostos presentes no malte (Dalberto; Niemes; Da Rosa, 2023), podendo resultar em quantidades similares a cervejas tradicionais ou até mesmo favorecer uma maior concentração.

Tabela 13. Valores médios para os parâmetros de teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e teor de proteínas totais e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2^2 .

Fatores			Valores médios \pm Desvio padrão ^a		
(A)	(B)	Amostra*	Fenólicos (mg/L)	Atividade antioxidante (% de inibição)	Proteínas (%)
(-)	(-)	Td	136,72 \pm 40,36	99,81 \pm 0,21	0,38 \pm 0,03
(+)	(-)	Mp	94,29 \pm 11,36	99,72 \pm 0,00	0,41 \pm 0,06
(-)	(+)	TdS	104,00 \pm 12,77	99,44 \pm 0,37	0,44 \pm 0,03
(+)	(+)	MpS	120,35 \pm 14,70	99,67 \pm 0,21	0,44 \pm 0,07

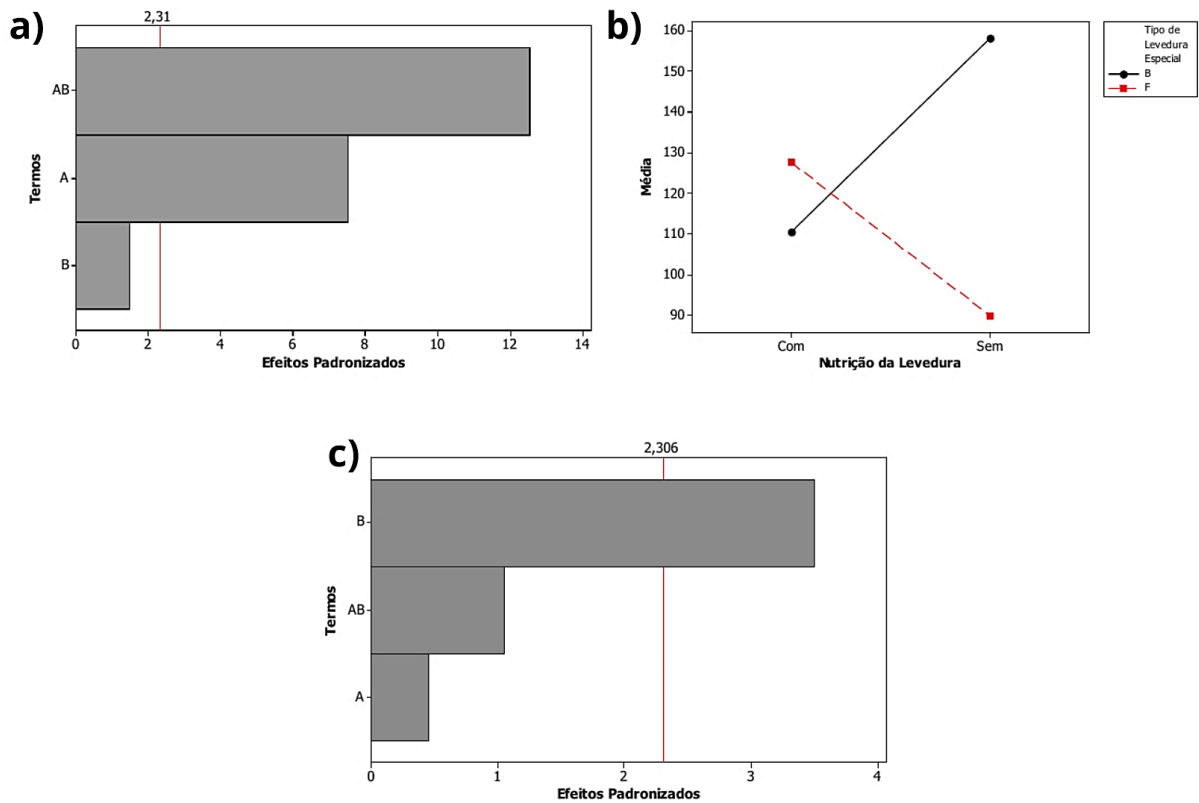
^aDesvios padrão calculados a partir das triplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *Td: levedura *Torulasporea delbrueckii*; Mp: levedura *Metschnikowia pulcherrima*; S: nutrição com *Servomyces*.

A análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança para os parâmetros de teor de compostos fenólicos (**Figura 15 (a)**) apontou que o fator tipo de levedura especial é significativo, pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Ainda, observa-se que houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas. Assim, esse fator não pode ser analisado separadamente, pois os seus efeitos dependem dos níveis de outras variáveis.

Nota-se diferenças nos valores para teor de compostos fenólicos ao utilizar duas leveduras especiais diferentes, e essa disparidade é influenciada pelas distintas vias metabólicas das duas leveduras empregadas, onde a levedura *T. delbrueckii* demonstra uma propensão a gerar uma quantidade mais elevada desses compostos em comparação com a levedura *M. pulcherrima* (He *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2023).

Os efeitos de interação de dois fatores (**Figura 15 (b)**) indicam que o menor valor para teor de compostos fenólicos é obtido ao utilizar a levedura *M. pulcherrima* sem a nutrição adicional, bem como o maior valor ao associar a levedura *T. delbrueckii* ainda sem a nutrição, demonstrando que o tipo de levedura exerce grande influência neste parâmetro.

Figura 15. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de compostos fenólicos (a) e atividade antioxidante (c) das amostras de cerveja. Gráfico do efeito de interação entre tipo de levedura não-*Saccharomyces* e nutrição da levedura para o teor de compostos fenólicos (b).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Para o parâmetro de atividade antioxidante, a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança demonstra que o fator B, nutrição da levedura, é significativo, pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$ (**Figura 15 (c)**). Já para o teor de proteínas, se observou que nenhum dos fatores principais A e B foram significativos. Não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas para ambos os parâmetros, portanto, pode-se fazer a otimização de cada fator de maneira univariada, pois os efeitos não dependem dos níveis dos fatores avaliados.

Embora exista diferença estatística para o parâmetro de atividade antioxidante em relação a nutrição adicional das leveduras, em comparação a essa ausência de nutrição, os valores obtidos para todas as amostras, apresentados na **Tabela 13**, mostram-se superiores aos

obtidos por Dziędziński e colaboradores (2023), em torno de 60%, e por Coulibaly e colaboradores (2023), com aproximadamente 70% de percentual de inibição. Assim, a cerveja desenvolvida neste estudo apresenta potencial benéfico aos consumidores.

Outro parâmetro importante para a qualidade de cervejas é o teor de proteínas (macromoléculas formadas por aminoácidos), que são encontradas no mosto e na cerveja, com sua principal origem nos grãos de malte. Durante as etapas de fervura e resfriamento pós-fervura, grande parte dessas proteínas é precipitada e removida, além de uma parte ser consumida pelo processo de fermentação, restando apenas resíduos de proteínas (Canónico *et al.*, 2021).

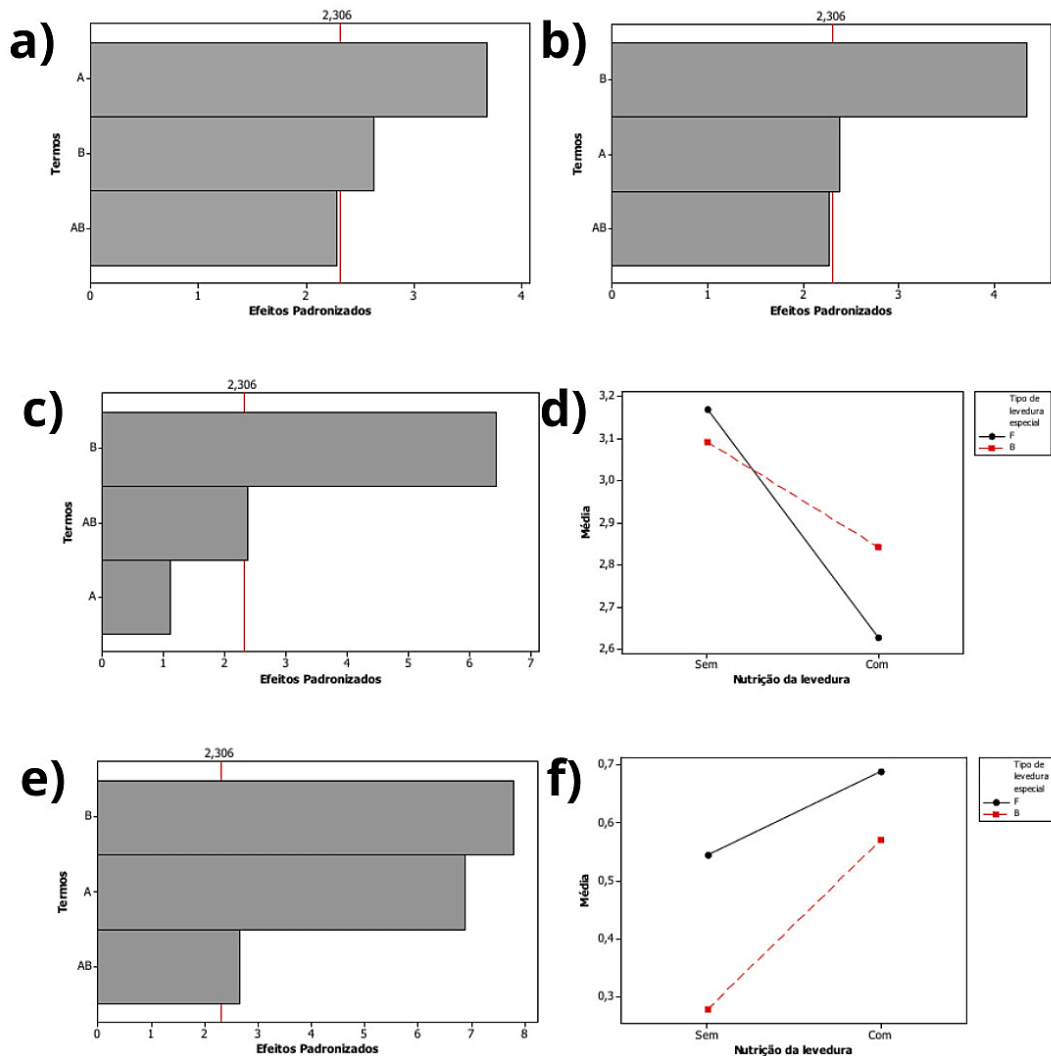
Desta forma, obteve-se valores para o parâmetro de teor de proteínas entre 0,38 e 0,44% (**Tabela 13**). Estudos conduzidos por Canónico e colaboradores (2021) encontraram teores entre 1,9 e 1,7% para amostras de cerveja utilizando a técnica de brassagem tradicional, a quente, e a levedura especial *Torulaspora delbrueckii*. Tal diferença se encontra na utilização da técnica *Cold Mash* empregada no presente estudo, pois a baixa temperatura utilizada favorece uma menor extração de proteínas dos grãos de malte.

Os valores inferiores obtidos em comparação ao reportado pela literatura para a concentração de proteínas demonstram a necessidade da sequência desta pesquisa, onde deverá ser analisado o teor de glúten nessas cervejas em estudos futuros, que poderá ser baixa o suficiente para ser caracterizada como cerveja sem glúten, ou seja, abaixo de 20 ppm, abrindo espaço para se atingir diferentes consumidores (Gasiński *et al.*, 2023).

Durante o processo de fermentação alcoólica, alguns elementos metálicos, classificados como micronutrientes, apresentam funções importantes para o bom desenvolvimento desta etapa. Essas funções estão relacionadas com o metabolismo celular das leveduras, assim, os metais zinco e manganês apresentam função enzimática, atuando como centros catalíticos e ativadores enzimáticos da glicólise. O potássio atua como ativador de reações da glicólise e em outras etapas do metabolismo na fermentação alcoólica, além de ser o metal presente em maior concentração. Já o magnésio desempenha funções relacionadas ao crescimento das leveduras como co-fator de diversas reações. Por fim, o cálcio protege a atividade das enzimas alfa-amilase da inibição pelo calor, além de contribuir para a diminuição do pH (Gama *et al.*, 2017; Leão *et al.*, 2018; Roca-Mesa *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2022; Manousi *et al.*, 2022).

Para o perfil mineral das amostras, a análise do teste- t e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança demonstra que, para os metais zinco, cálcio e manganês, os dois fatores principais, A e B (tipo de levedura especial e nutrição da levedura), são significativos (**Figura 16 (a), (b) e (e)**), pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Para o potássio, apenas o fator principal B é significativo (**Figura 16 (c)**), e para o magnésio, nenhum dos fatores principais foram significativos.

Figura 16. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de zinco (a), cálcio (b), potássio (c), manganês (e) das amostras de cerveja. Gráficos do efeito de interação entre tipo de levedura não-*Saccharomyces* e nutrição da levedura para o teor de potássio (d) e manganês (f).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Em relação ao efeito principal tipo de levedura especial, nota-se que a concentração após a fermentação dos metais zinco e cálcio foi maior quando se utilizou a levedura *T*.

delbrueckii e menor quando utilizado a levedura *M. pulcherrima* (**Tabela 14**), demonstrando que esta apresentou maior consumo destes elementos. Para o manganês, tem-se a situação contrária: a levedura *T. delbrueckii* apresentou maior consumo, resultando em menor concentração em relação a *M. pulcherrima*.

Tabela 14. Valores médios para o perfil mineral e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores			Valores médios (mg/L) ± Desvio padrão ^a				
(A)	(B)	Amostra*	Zn	Ca	Mg	K	Mn
(-)	(-)	Td	0,43 ± 0,09	1,94 ± 0,94	0,26 ± 0,05	3,01 ± 0,03	0,28 ± 0,02
(+)	(-)	Mp	0,18 ± 0,01	1,08 ± 0,16	0,25 ± 0,05	3,17 ± 0,03	0,51 ± 0,07
(-)	(+)	TdS	0,23 ± 0,02	0,68 ± 0,02	0,28 ± 0,01	2,84 ± 0,07	0,57 ± 0,04
(+)	(+)	MpS	0,17 ± 0,11	0,65 ± 0,03	0,25 ± 0,03	2,63 ± 0,20	0,68 ± 0,09

^aDesvios padrão calculados a partir das triplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *Td: levedura *Torulasporea delbrueckii*; Mp: levedura *Metschnikowia pulcherrima* S: nutrição com Servomyces.

Para o efeito principal nutrição da levedura, observa-se que o consumo de zinco, cálcio e potássio foi maior quando se promoveu a nutrição adicional de ambas as leveduras, indicando um bom andamento do processo fermentativo (Udeh; Kgatla, 2013). Observa-se que houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas para os metais potássio e manganês (**Figura 16 (d) e (f)**). Assim, esse fator não pode ser analisado separadamente, pois os seus efeitos dependem dos níveis de outras variáveis.

Em relação ao magnésio, embora não existam diferenças estatísticas para a sua concentração de acordo com as diferentes condições de fermentação, é possível apontar um maior consumo quando se promove a nutrição das leveduras. Como consequência, se observa que essas amostras resultaram em maiores valores para o teor alcoólico (**Tabela 12**), pois esse metal atua para que se obtenha máxima eficiência fermentativa por ser cofator de diversas enzimas envolvidas na fermentação alcoólica (Nolasco *et al.*, 2020).

4.3 Cerveja de baixo teor alcoólico

4.3.1 Resultados e Discussão

Para a segunda etapa do estudo de fermentação, avaliou-se a técnica de *cold mash* em conjunto com a fermentação utilizando levedura não-*Saccharomyces* (*Torulaspóra delbrueckii*) em associação a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, pois o intuito era obter-se cervejas de baixo teor alcoólico (entre 0,5 e 2,0%) (MAPA, 2019). Assim, como constatado anteriormente, ao se utilizar apenas as leveduras não-*Saccharomyces*, se obtém cervejas sem álcool (até 0,5%), e ao realizar a fermentação apenas com a *S. cerevisiae*, resulta-se em cervejas tradicionais (graduação alcoólica superior a 2,0%) (Rosa; Afonso, 2015).

Assim, os parâmetros avaliados foram os mesmos descritos para a cerveja sem álcool (item 4.2), podendo-se observar os resultados encontrados para o perfil físico-químico na **Tabela 15**, teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e teor de proteínas na **Tabela 16**, e perfil mineral na **Tabela 17**.

Para avaliar a influência das variáveis proporção de levedura não-*Saccharomyces* e nutrição da levedura na etapa de fermentação, utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 . Em relação aos parâmetros físico-químicos, a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança (**Figura 17 (a)**) apontou que todos os fatores estudados para o teor alcoólico são significativos, bem como o efeito de interação (**Figura 17 (c)**), pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Assim, esses fatores não podem ser analisados separadamente, pois os seus efeitos dependem dos níveis de outras variáveis.

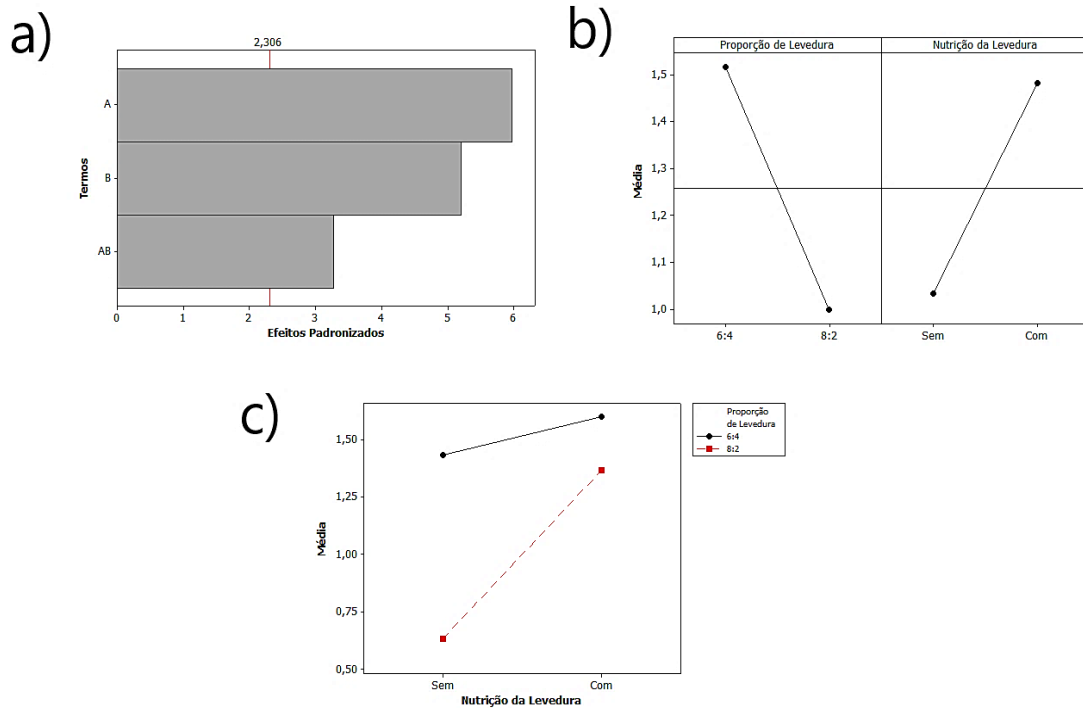
Tabela 15. Valores médios para os parâmetros físico-químicos e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores			Valores médios ± Desvio padrão ^a					
(A)	(B)	Amostra*	Sólidos solúveis (°Brix)	Teor alcoólico (%)	pH	Acidez total (mEq/L)	Cor (EBC)	Amargor (IBU)
(-)	(-)	6:4	5,15 ± 0,06	1,43 ± 0,25	4,83 ± 0,06	36,70 ± 3,01	10,00 ± 0,50	14,20 ± 1,20
(+)	(-)	8:2	5,15 ± 0,06	0,63 ± 0,11	4,77 ± 0,06	38,00 ± 5,30	10,00 ± 0,50	13,90 ± 0,90
(-)	(+)	6:4S	5,15 ± 0,06	1,60 ± 0,10	4,80 ± 0,10	38,00 ± 2,00	9,00 ± 0,50	14,60 ± 0,40
(+)	(+)	8:2S	5,15 ± 0,06	1,37 ± 0,06	4,77 ± 0,06	38,00 ± 3,46	10,00 ± 0,50	14,40 ± 0,90

^aDesvios padrão calculados a partir das triplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *6:4: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (60%) : *S. cerevisiae* (40%); 8:2: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (80%) : *S. cerevisiae* (20%); S: nutrição com *Servomyces*.

Entre os efeitos principais (**Figura 17 (b)**), se observa que o menor teor alcoólico é obtido ao utilizar-se a proporção de 80% de levedura *T. delbrueckii* e 20% de *S. cerevisiae*, ou seja, a maior quantidade de não-*Saccharomyces* entre todas as condições estudadas, alcançando-se um teor de 0,63%. Isso acontece porque essa espécie converte os açúcares fermentáveis encontrados no mosto cervejeiro em outros compostos, especialmente ésteres, ao invés de produzir preferencialmente etanol, como acontece para a *S. cerevisiae*. A produção de etanol pela *T. delbrueckii* é mínima, como observado para as amostras de cerveja sem álcool (Pereira-Junior, 2019; Canonico *et al.*, 2021; Johansson *et al.*, 2021).

Figura 17. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor alcoólico (a). Gráfico dos efeitos principais proporção de levedura e nutrição da levedura (b) e gráfico do efeito de interação de dois fatores (c).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A medida em que a proporção de *S. cerevisiae* aumenta, observa-se também o aumento no teor alcoólico (Tabela 1 e Figura 17 (b e c)), chegando-se ao teor de 1,43%, devido à grande eficiência desta espécie para produção de etanol (Pirrone *et al.*, 2022). Assim, pode-se descrever o efeito principal A (proporção de levedura não-*Saccharomyces*) como um efeito antagônico, pois o aumento na quantidade de *T. delbrueckii* acarreta na diminuição do teor alcoólico.

Em relação ao efeito principal B (nutrição da levedura), se observa os menores teores alcoólicos quando não se realiza a nutrição (0,63% e 1,43%) e os maiores ao promover a nutrição das leveduras (1,37 e 1,60%), caracterizando-o como um efeito principal sinérgico, pois essa nutrição resulta em uma fermentação alcoólica com maior eficiência devido a dosagem correta de minerais essenciais para o metabolismo desses microrganismos e para um bom andamento da etapa de fermentação. Além de uma produção de etanol mais eficiente, a nutrição também contribui para a diminuição de *off-flavors*, podendo impactar de maneira positiva no perfil sensorial das amostras de cerveja (Roca-Mesa *et al.*, 2022; Manousi *et al.*, 2022).

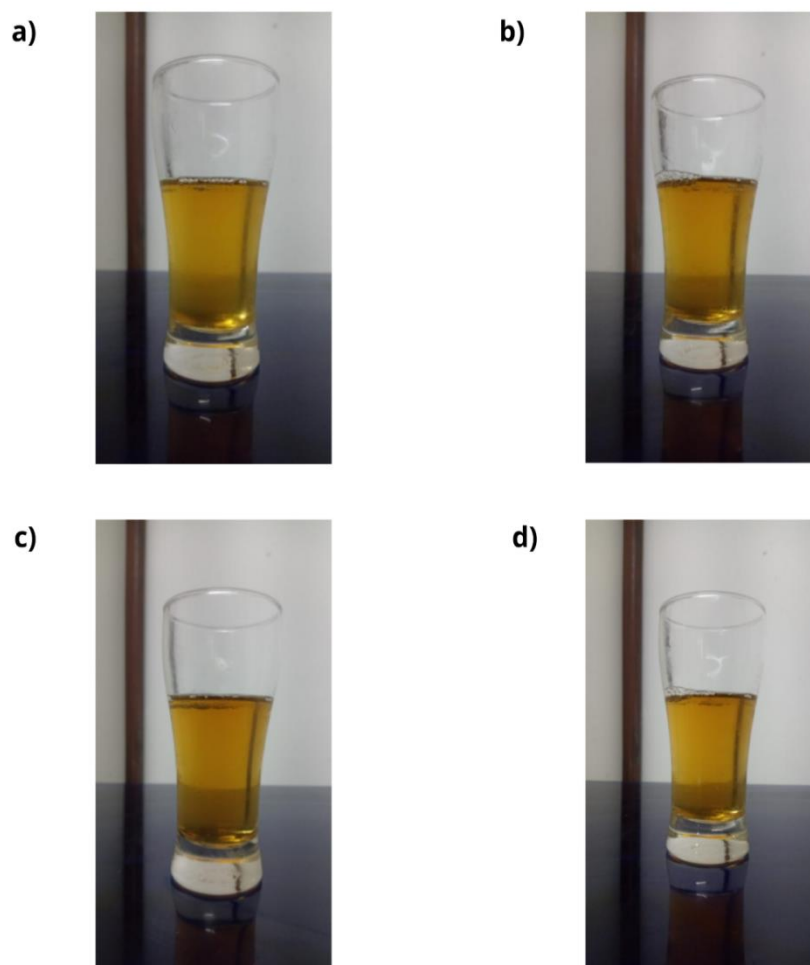
Assim, o menor teor alcoólico é obtido ao utilizar maior proporção de *T. delbrueckii* e ao não promover a nutrição adicional (**Figura 17 (c)**). Porém, como todas as amostras produzidas classificam-se como cervejas de baixo teor alcoólico (até 2,0%), pode-se dar preferência para as amostras em que utilizou essa nutrição, a fim de se preservar uma característica sensorial mais agradável aos consumidores e que se assemelhe mais às cervejas tradicionais do estilo Pilsen.

Para os demais parâmetros físico-químicos (teor de sólidos solúveis, pH, acidez total, cor e amargor), a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança demonstra que nenhum dos fatores estudados são significativos, pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p > 0,05$. Além disso, observou-se que não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas. Desta forma, é possível fazer a otimização de cada fator de maneira univariada, pois os efeitos não dependem dos níveis dos fatores estudados.

Para a análise de teor de sólidos solúveis, obteve-se 5,15 °Brix para todas as amostras, pois esta etapa do estudo avaliou diferentes condições apenas para a fermentação, mantendo-se o estágio de brassagem sem variações. A legislação brasileira e diversos estudos estabelecem quantidades entre 10 e 12 °Brix, aproximadamente, para a produção de cervejas Pilsen utilizando a brassagem tradicional (Rosa; Afonso, 2015; MAPA, 2019). Essa diferença reside na aplicação da técnica de *cold mash*, como já discutido anteriormente, e essa menor quantidade de sólidos solúveis é um dos motivos que possibilita a obtenção de menores teores de álcool (Dalberto et al., 2021; Dalberto; Niemes; Da Rosa, 2023).

Para os demais parâmetros, pH, acidez total, cor (**Figura 18**) e amargor, observa-se resultados em concordância com o disposto na legislação brasileira e com valores semelhantes ao reportado pela literatura (Branyik *et al.*, 2012; Sousa; Fogaça, 2019; Kutkoski *et al.*, 2019; Gabbardo, 2020; BJCP, 2021).

Figura 18. Cervejas de baixo teor alcoólico preparadas utilizando a técnica de *cold mash*. a) 6:4: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (60%) : *S. cerevisiae* (40%); b) 8:2: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (80%) : *S. cerevisiae* (20%); c) 6:4: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (60%) : *S. cerevisiae* (40%) com *Servomyces*; d) 8:2: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (80%) : *S. cerevisiae* (20%) com *Servomyces*.

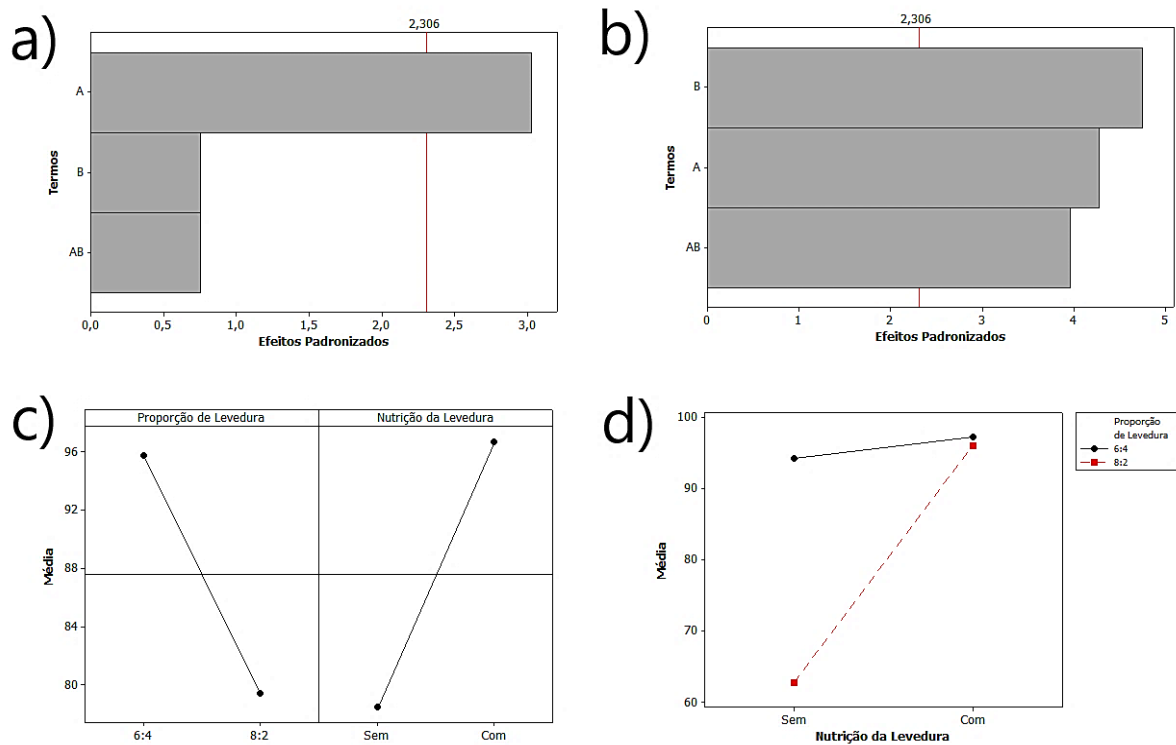


Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Além das análises físico-químicas, avaliou-se também o teor de compostos fenólicos das amostras de cerveja, pois esse grupo de compostos sofre influência de leveduras não-Saccharomyces, como a *T. delbrueckii* (He *et al.*, 2023). Assim, observa-se que a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança (**Figura 19 (b e c)**) apontou que todos os fatores estudados para o teor de compostos fenólicos são significativos, bem como o efeito de interação de dois fatores (**Figura 19 (d)**), pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Assim, esses fatores não podem ser analisados separadamente, pois os seus efeitos

dependem dos níveis de outras variáveis.

Figura 19. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado à atividade antioxidante (a) e ao teor de compostos fenólicos (b). Gráfico dos efeitos principais (c) e do efeito de interação de dois fatores para o teor de compostos fenólicos (d).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Entre os efeitos principais (**Figura 19 (c)**), nota-se que, para a proporção de levedura, o maior valor no teor de compostos fenólicos é alcançado quando se utiliza menor quantidade da *T. delbrueckii*, obtendo-se 92,48 mg/L, e o menor valor, quando é utilizado maior quantidade de *T. delbrueckii*, resultando em 59,75 mg/L, como pode ser observado na **Tabela 16**. Isso acontece porque o metabolismo dessa espécie tem a propriedade de gerar compostos fenólicos, aumentando o conteúdo de ácidos hidroxicinâmicos e flavan-3-óis, conforme demonstrado por He e colaboradores (2023).

Para o fator nutrição da levedura (**Figura 19 (c)**), observa-se maior concentração de fenólicos quando se promove essa nutrição adicional (96,11 e 88,84 mg/L), pois se possibilita uma fermentação com maior eficiência (Gama *et al.*, 2017; Leão *et al.*, 2018).

A **Figura 19 (d)** demonstra a interação entre esses dois fatores, onde é possível observar valores próximos para as duas proporções de leveduras (8:2 e 6:4) quando ambas recebem nutrição adicional. Assim, pode-se dar preferência para uma formulação que preserve maior proporção de *T. delbrueckii* a fim de se obter uma bebida com maior complexidade sensorial e que se assemelhe com cervejas de teor alcoólico tradicional.

Tabela 16. Valores médios para os parâmetros de teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e teor de proteínas e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores			Valores médios \pm Desvio padrão ^a		
(A)	(B)	Amostra*	Fenólicos (mg/L)	Atividade antioxidante (% de inibição)	Proteínas (%)
(-)	(-)	6:4	92,48 \pm 7,71	99,50 \pm 0,08	0,62 \pm 0,10
(+)	(-)	8:2	59,75 \pm 12,00	99,25 \pm 0,08	0,59 \pm 0,11
(-)	(+)	6:4S	96,11 \pm 5,14	99,40 \pm 0,16	0,65 \pm 0,15
(+)	(+)	8:2S	88,84 \pm 11,35	99,25 \pm 0,08	0,65 \pm 0,09

^aDesvios padrão calculados a partir das triplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *6:4: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (60%) : *S. cerevisiae* (40%); 8:2: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (80%) : *S. cerevisiae* (20%); S: nutrição com *Servomyces*.

Visto que a capacidade antioxidante dos compostos fenólicos exerce influências na qualidade sensorial da cerveja, como pontuado anteriormente (Petrón *et al.*, 2021; Carvalho; Guido, 2022), se observa que a proporção de levedura não-*Saccharomyces* (fator principal A) foi significativa para a avaliação da atividade antioxidante (**Figura 19 (a)**), pois, a medida que a concentração desses compostos tornou-se maior, o percentual de inibição das amostras também aumentou (99,25 para 99,50%, **Tabela 16**).

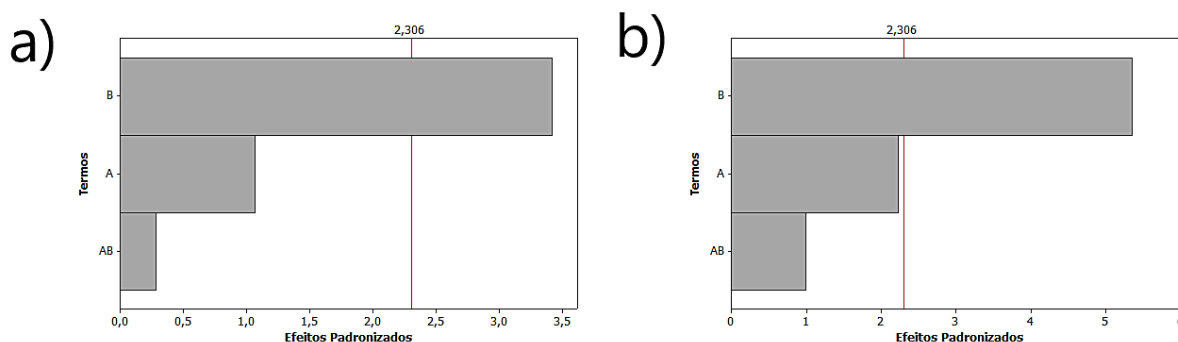
Os valores obtidos para a atividade antioxidante das amostras de cerveja de baixo teor alcoólico foram inferiores aos da cerveja sem álcool, ambos avaliados nesta pesquisa, mas mostraram-se superiores aos obtidos por Dziejński e colaboradores (2023), com 60% de percentual de inibição, e por Coulibaly e colaboradores (2023), com aproximadamente 70%.

Para o parâmetro de teor de proteínas, importante indicador da qualidade de cervejas (Canónico *et al.*, 2021), a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança demonstra que nenhum dos fatores principais A e B foram significativos, pois os valores de $t_{\text{calculado}} < t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p > 0,05$. Não houve um efeito de interação significativo entre as variáveis estudadas, portanto, pode-se fazer a otimização de cada fator de maneira univariada, pois os efeitos não dependem dos níveis dos fatores avaliados.

Assim como para as cervejas sem álcool, as amostras de baixo teor alcoólico apresentaram teores de proteínas inferiores ao reportado pela literatura, como aponta Canónico e colaboradores (2021), que encontraram teores entre 1,9 e 1,7%. Isso acontece porque a técnica de *cold mash* demonstrou grande influência para este parâmetro, pois no momento em que os grãos de malte estão em contato com a água para que ocorra a extração de diversos compostos, entre eles as proteínas, não há o aquecimento, trabalhando-se em temperaturas inferiores a 10°C, o que favorece as baixas concentrações (Dalberto *et al.*, 2021; Dalberto; Niemes; Da Rosa, 2023).

Para o perfil mineral das amostras, a análise do teste-*t* e do gráfico de Pareto no nível de 95% de confiança demonstra que, para os metais zinco e cálcio, apenas o fator principal B (nutrição da levedura) é significativo (**Figura 20 (a) e (b)**, respectivamente), pois os valores de $t_{\text{calculado}} > t_{\text{crítico}}$ e os valores de $p < 0,05$. Para os demais metais, magnésio, potássio e manganês, o fator B não é significativo, e para todos os metais, o fator principal A (proporção de levedura) não é significativo, bem como o efeito de interação de dois fatores.

Figura 20. Gráficos de Pareto no nível de confiança de 95% para os efeitos padronizados do planejamento fatorial aplicado ao teor de zinco (a) e cálcio (b).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

De acordo com Lallemand Inc.[©], a cepa de levedura enriquecida naturalmente com minerais utilizada para promover a nutrição de leveduras cervejeiras apresenta 55 ppm do elemento zinco em sua composição, que foi adicionado proporcionalmente durante o preparo das amostras deste estudo. Com base na **Tabela 17**, se observa que o Zn apresentou maior concentração quando não foi realizada a nutrição das leveduras, e menor concentração ao realizar essa nutrição adicional, ou seja, houve maior consumo desse mineral ao promover a nutrição.

Tabela 17. Valores médios para o perfil mineral e seus desvios padrão obtidos pelo planejamento fatorial 2².

Fatores			Valores médios (mg/L) ± Desvio padrão ^a				
(A)	(B)	Amostra*	Zn	Ca	Mg	K	Mn
(-)	(-)	6:4	1,00 ± 0,10	0,90 ± 0,13	0,36 ± 0,04	3,16 ± 0,09	0,63 ± 0,08
(+)	(-)	8:2	1,07 ± 0,09	0,70 ± 0,10	0,35 ± 0,07	2,81 ± 0,16	0,68 ± 0,05
(-)	(+)	6:4S	0,66 ± 0,07	0,51 ± 0,12	0,34 ± 0,03	3,03 ± 0,06	0,71 ± 0,04
(+)	(+)	8:2S	0,78 ± 0,28	0,43 ± 0,04	0,34 ± 0,04	2,92 ± 0,03	0,66 ± 0,17

^aDesvios padrão calculados a partir das triplicatas dos ensaios do planejamento fatorial. *6:4: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (60%) : *S. cerevisiae* (40%); 8:2: proporção de leveduras *T. delbrueckii* (80%) : *S. cerevisiae* (20%); S: nutrição com Servomyces.

Udeh e Kgatla (2013) relatam a importância de teores adequados de minerais durante a condução do processo fermentativo, sendo o zinco um dos principais devido a sua atuação como centro catalítico e ativador enzimático da glicólise. Assim, seu maior consumo na condição em que se promoveu a nutrição indica que a fermentação ocorreu com maior eficiência.

Para o elemento cálcio, nota-se comportamento semelhante em relação ao Zn: maior concentração sem a nutrição das leveduras, e menor concentração ao realizar a nutrição, indicando maior consumo ao promover a nutrição. Devido a sua importância para a etapa de fermentação, em conjunto com os demais elementos, a presença deste micronutriente torna-se essencial para a obtenção de cervejas agradáveis e equilibradas sensorialmente (Leão *et al.*, 2018; Roca-Mesa *et al.*, 2022).

4.4 Conclusões parciais

O estudo da etapa de fermentação durante o desenvolvimento de cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico demonstrou que o tipo de levedura utilizado (*Torulaspora delbrueckii* e *Metschnikowia pulcherrima*) foi o fator principal mais importante, afetando sistematicamente a resposta. Isso se deve às distintas vias metabólicas utilizadas pelas diferentes cepas de leveduras. Os parâmetros de pH, acidez total, cor, amargor e teor de compostos fenólicos encontram-se próximos ao reportado pela literatura e pelos guias oficiais cervejeiros, obedecendo a legislação vigente.

A atividade antioxidante das amostras de cerveja se mostrou superior ao reportado pela literatura, e o teor de proteínas, inferior ao encontrado para cervejas tradicionais, demonstrando ser uma bebida com potencial em contribuir de maneira positiva para a melhora de hábitos e na diminuição do consumo de álcool.

CAPÍTULO 5: ANÁLISE SENSORIAL

5. ANÁLISE SENSORIAL

5.1 Materiais e métodos

Esta pesquisa teve seu projeto submetido à apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro-Oeste – Unicentro/PR (parecer nº 6.058.983). A análise foi realizada no laboratório de análise sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos da Unicentro. Os participantes foram orientados quanto aos procedimentos e a proteção de sua privacidade, e demonstraram seu consentimento ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE, Anexos A e B), conforme a Resolução nº 466/12 do Ministério da Saúde (Brasil, 2003).

As amostras de cervejas foram submetidas à avaliação sensorial para averiguar a preferência, perfil de atributos e testes de preferência. Os julgadores realizaram os testes em cabines individuais, com luz branca, em temperatura ambiente. Cada julgador recebeu as amostras de cerveja em copos de plástico transparentes e descartáveis, devidamente rotuladas e codificadas com algarismos de três dígitos escolhidos de forma aleatória, contendo aproximadamente 20 mL de cerveja, água mineral e biscoito do tipo *cream cracker* para a limpeza das papilas gustativas entre a avaliação de cada amostra. A ficha do teste correspondente se encontra no Anexo C.

Foram apresentados três tipos de amostras de cerveja para apreciação dos provadores. O perfil de atributos foi constituído pela avaliação da aparência, aroma e sabor, com notas de 1 a 5. Os testes de preferência consistiram na frequência de consumo, com 7 pontos de escolha, e de qualidade, com 5 pontos. Ainda, os participantes avaliaram as amostras quanto à sua semelhança com uma cerveja Pilsen tradicional, julgando como a mais parecida e a menos parecida.

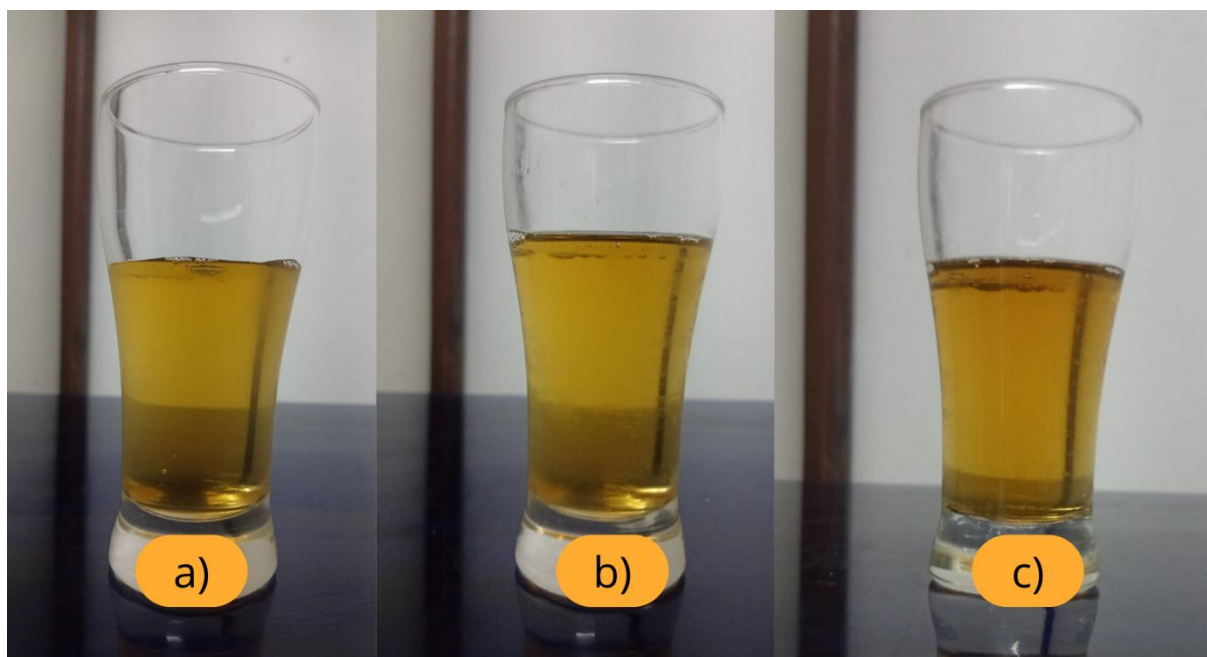
5.1.1 Análise estatística dos dados

Para investigar diferenças significativas nos atributos avaliados para a amostra de cerveja padrão e formulações sem álcool, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de um fator. Toda a análise estatística foi realizada no nível de 95% de confiança, e o teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o software Minitab v. 16.2.2 (MINITAB, 2010).

5.2 Resultados e Discussão

A análise sensorial foi realizada para avaliar a aceitação das cervejas sem álcool e compará-las com uma amostra padrão, de teor alcoólico tradicional, em torno de 4,5% (Brasil, 2019). Para as amostras sem álcool, foram escolhidas as formulações com diferentes modificações na etapa de fermentação a fim de se verificar possíveis alterações nas características sensoriais. Desta forma, as cervejas selecionadas foram uma amostra fermentada apenas com a levedura *Torulaspora delbrueckii*, uma amostra em que se realizou a nutrição da *T. delbrueckii* (TdS), e uma amostra de cerveja padrão, sendo todas preparadas em laboratório com as mesmas matérias primas, que são apresentadas, respectivamente, na **Figura 21**.

Figura 21. Cervejas produzidas utilizando: a) levedura *Torulaspora delbrueckii*, b) levedura *T. delbrueckii* com nutrição utilizando *Servomyces* (TdS); b) cerveja padrão.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

As amostras de cervejas foram registradas antes de se realizar as análises de caracterização, assim, ainda não haviam passado pela etapa de gaseificação, pois haveria influência nos resultados obtidos. Portanto, o colarinho das cervejas se formou e se dissipou rapidamente, pois a carbonatação auxilia na sua permanência. Para a realização da análise sensorial, as amostras foram gaseificadas adequadamente.

A escolha das duas formulações de cerveja sem álcool consistiu em amostras em que se utilizou a mesma levedura, onde, em análises preliminares, se observou que a *T. delbrueckii*

apresentou atributos sensoriais mais agradáveis em relação a *M. pulcherrima*, para que fosse possível comparar a nutrição adicional durante a etapa de fermentação, que tem o objetivo de melhorar o perfil sensorial. Além disso, as duas amostras foram produzidas utilizando a técnica de brassagem *cold mash*, para que se pudesse, juntamente com a levedura não-*Saccharomyces*, obter cervejas sem álcool (até 0,5%), e também manter as características conferidas por essa técnica (Dalberto et al., 2021; Dalberto; Niemes; Da Rosa, 2023).

Assim, a **Tabela 18** apresenta as notas obtidas para os atributos sensoriais de aparência, aroma e sabor avaliados, onde a escala de notas variou de 1 a 5, sendo “1” para “péssimo” e “5” para “excelente”.

Tabela 18. Notas obtidas para os atributos sensoriais avaliados na cerveja padrão e cervejas sem álcool.

Atributo	<i>T. delbrueckii</i> *	TdS*	Padrão*
Aparência	4,45 ± 0,87 ^a	4,29 ± 0,93 ^a	4,12 ± 1,04 ^a
Aroma	3,66 ± 1,22 ^a	3,61 ± 1,14 ^a	3,69 ± 1,12 ^a
Sabor	3,61 ± 1,22 ^a	3,11 ± 1,23 ^a	3,33 ± 1,41 ^a

* Letras iguais para cada parâmetro indicam que não existem diferenças significativas a 95% de confiança por meio da aplicação do teste de comparação múltipla de médias de Tukey.

Todos os atributos avaliados, aparência, aroma e sabor, não apresentaram diferenças significativas entre as amostras ($F_{\text{calculado}} < F_{\text{crítico}}$ e valor de $p > 0,05$), demonstrando que as amostras sem álcool foram consideradas iguais à amostra padrão (**Tabela 18**). Para aparência, obteve-se notas acima de 4 pontos, considerando-se um resultado satisfatório, visto que a nota máxima é de 5 pontos, além de comprovar que a técnica de *cold mash* alcançou resultados satisfatórios ao trazer coloração mais intensa para as cervejas sem álcool. Para aroma e sabor, as notas variaram entre 3,11 e 3,69, indicando que esses atributos podem ser melhorados para oferecer uma melhor experiência sensorial aos futuros consumidores.

Assim, é possível notar que as modificações realizadas no processo de produção para a obtenção de um teor alcoólico menor não alteraram as características sensoriais das novas formulações de cerveja sem álcool, em comparação ao processo tradicional.

Além do perfil de atributos, a análise sensorial também avaliou testes de preferência, para frequência em que os provadores poderiam consumir as amostras, e para a qualidade de cada cerveja. Na **Tabela 19** estão apresentadas as notas para a frequência de consumo, em que a escala varia de 1 a 7, sendo “1” para “nunca consumiria” e “7” para “consumiria sempre”, e as notas para a qualidade das cervejas em comparação com aquela que os participantes costumam consumir, com uma escala de 1 a 5, sendo “1” para “qualidade muito inferior”, “3” para “qualidade semelhante” e “5” para “qualidade muito superior”.

Tabela 19. Notas obtidas para a frequência de consumo e a qualidade da cerveja padrão e cervejas sem álcool.

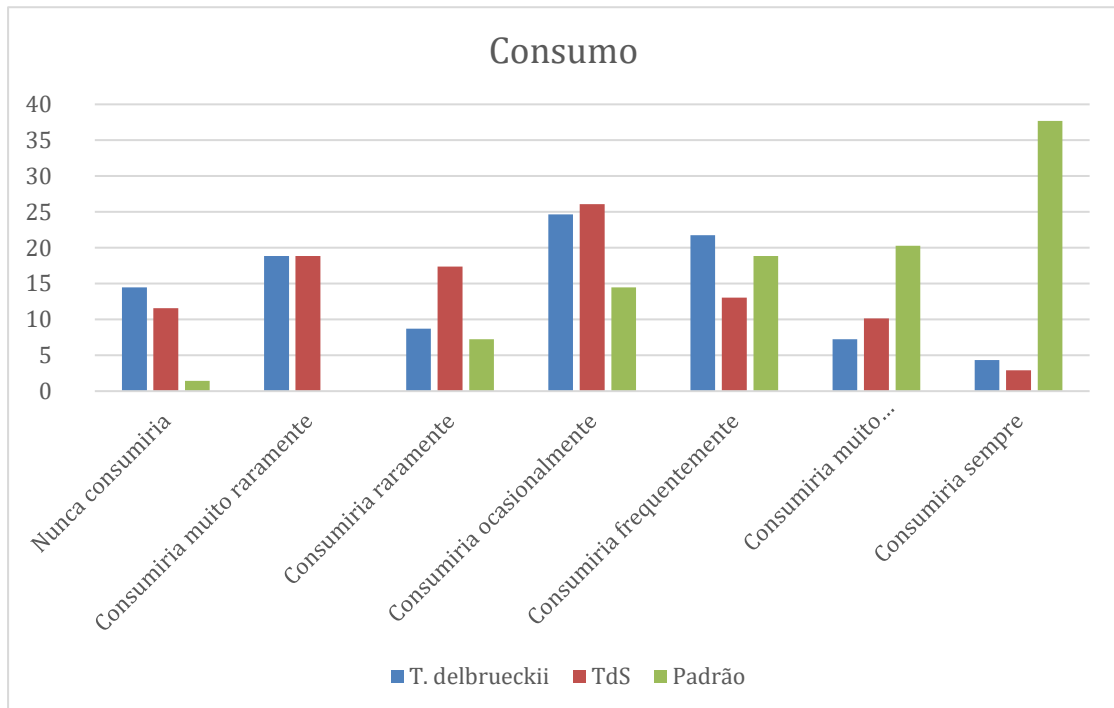
Teste de Preferência	<i>T. delbrueckii</i> *	TdS*	Padrão*
Frequência de Consumo	3,60 ± 1,73 ^b	3,34 ± 1,52 ^b	5,54 ± 1,52 ^a
Qualidade da Cerveja	2,31 ± 1,04 ^b	2,40 ± 0,89 ^b	3,40 ± 1,06 ^a

* Letras iguais para cada parâmetro indicam que não existem diferenças significativas a 95% de confiança por meio da aplicação do teste de comparação múltipla de médias de Tukey.

Ambos os testes de preferência avaliados não apresentaram diferenças significativas para as amostras sem álcool, mas se mostraram estatisticamente diferentes em relação a cerveja padrão ($F_{\text{calculado}} > F_{\text{crítico}}$ e valor de $p < 0,05$), assim, é possível notar que, para uma média global das amostras, a cerveja de teor alcoólico tradicional ainda teria uma frequência de consumo maior.

Ao analisar essa frequência de acordo com a porcentagem obtida para cada ponto da escala de consumo (**Figura 22**), observa-se que a amostra padrão seria consumida sempre, e que as amostras sem álcool (*T. delbrueckii* e TdS) seriam consumidas ocasionalmente, e ainda, que a amostra *T. delbrueckii* obteve porcentagem próxima para a faixa de consumo “consumiria frequentemente”.

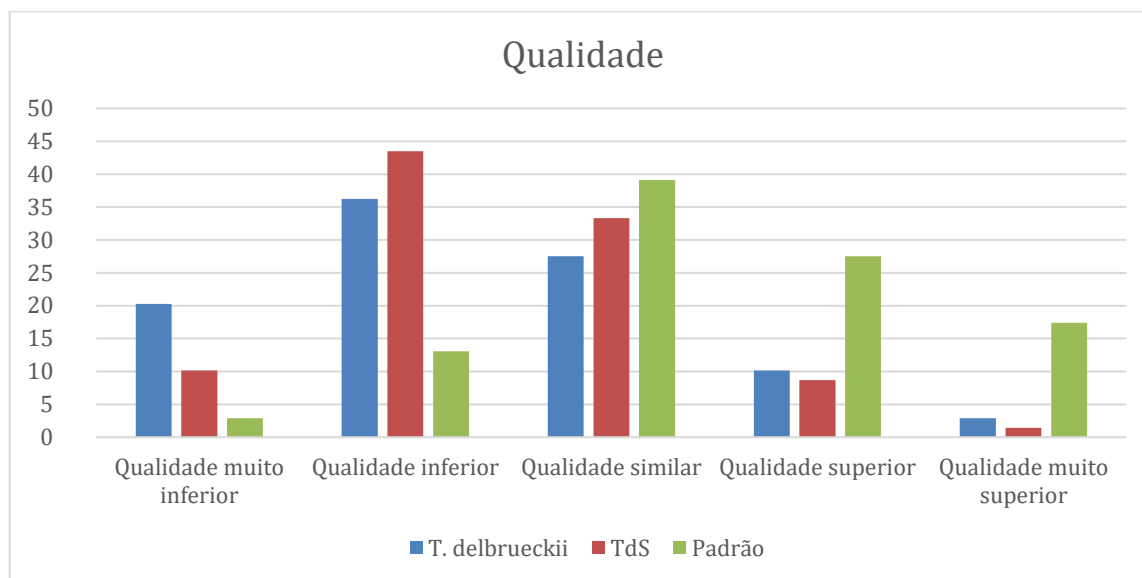
Figura 22. Frequência de consumo para as cervejas avaliadas em porcentagem de participantes.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A avaliação da qualidade da cerveja, que foi feita por meio da comparação com a cerveja que cada participante costuma consumir, obteve nota geral de 3,4 para a cerveja padrão, de 2,31 para *T. delbrueckii* e de 2,40 para TdS, onde as notas variavam de 1 a 5 (**Tabela 19**). A **Figura 23** apresenta o gráfico para a porcentagem de participantes para cada ponto avaliado na escala de qualidade.

Figura 23. Qualidade das cervejas avaliadas em porcentagem de participantes.



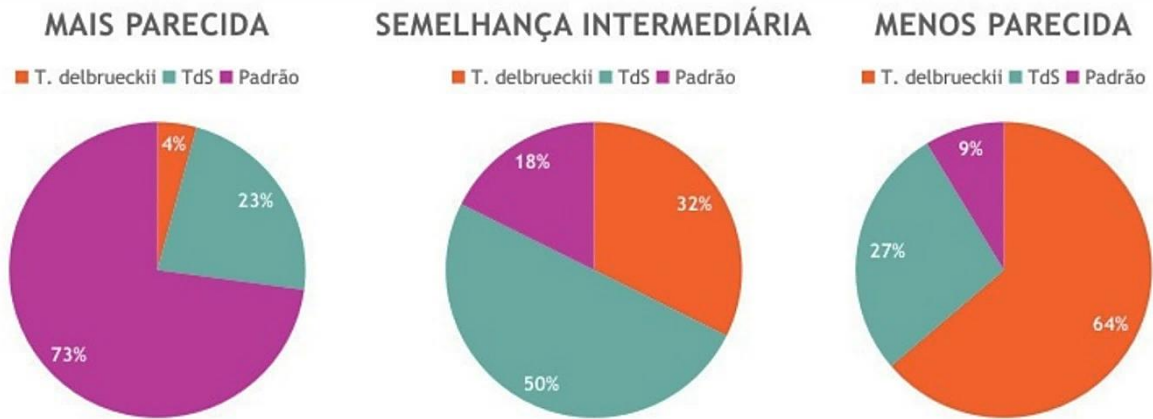
Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Observa-se que, para a cerveja padrão, os provadores atribuíram 16% das notas para as escalas 1 e 2 (qualidade muito inferior e inferior), 39% para qualidade similar (nota 3), e 45% para qualidade superior e muito superior (notas 4 e 5), demonstrando um bom andamento do processo produtivo. Para a amostra *T. delbrueckii*, obteve-se 56% das notas para qualidade muito inferior e inferior, e 44% para a soma de qualidade similar, superior e muito superior. Já para a cerveja TdS, o resultado foi de 53% para as notas 1 e 2, e 47% para as notas de 3 a 5.

Por fim, os provadores escolheram, entre as três amostras, qual seria menos parecida, a de semelhança intermediária e a mais parecida a uma amostra de cerveja Pilsen tradicional, e os resultados obtidos em porcentagem de participantes são apresentados na **Figura 24**.

É possível observar que a formulação onde se utilizou apenas a espécie *T. delbrueckii* na fermentação foi considerada a que menos se assemelhou a uma cerveja do estilo Pilsen, com 64% de votos para o tópico “menos parecida”. Já a amostra em que se promoveu a nutrição da *T. delbrueckii* foi julgada com uma semelhança intermediária ao estilo, com 50% dos provadores julgando-a desta maneira, e por fim, a amostra padrão reconhecida como a representante do estilo Pilsen, sendo votada por 73% dos participantes para o tópico “mais parecida”.

Figura 24. Escolha dos participantes quanto a semelhança a uma cerveja Pilsen tradicional: cerveja mais parecida, cerveja de semelhança intermediária e cerveja menos parecida.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Assim, é possível observar que a nutrição adicional na etapa de fermentação resultou em melhorias para o perfil sensorial da cerveja obtida, e que, embora a cerveja padrão tenha resultado em maior preferência dos participantes, as formulações sem álcool também obtiveram resultados satisfatórios, constatando as recentes tendências de mercado que indicam um crescimento na procura e consumo de bebidas sem álcool.

5.3 Conclusões parciais

A realização de uma análise sensorial apontou uma boa aceitação para as cervejas sem álcool desenvolvidas nesta pesquisa, onde as notas dadas aos atributos sensoriais se mostraram iguais aos da cerveja padrão. Os testes de preferência demonstraram que a cerveja tradicional ainda é consumida com maior frequência, porém, as amostras sem álcool também tiveram uma porcentagem satisfatória de escolha para um consumo regular por parte dos julgadores.

Essa análise permitiu identificar que a realização da nutrição das leveduras na etapa de fermentação influencia o perfil sensorial da cerveja, resultando em amostras mais agradáveis e equilibradas sensorialmente, propiciando uma maior aceitação aos consumidores.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÃO E REFERÊNCIAS

6. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou a possibilidade de se aliar a técnica inovadora de *Cold Mash* com o uso de leveduras não-*Saccharomyces* para o desenvolvimento de cervejas sem álcool e de baixo teor alcoólico. As características fornecidas por essa técnica de brassagem torna os atributos sensoriais das formulações desenvolvidas semelhante aos das cervejas de teor alcoólico tradicional, pois confere maior sabor e aroma maltados, mais corpo e não deixa residual de açúcares elevados, como demonstrado por estudos anteriores.

Análises físico-químicas demonstraram semelhanças com dados reportados pela literatura e com guias oficiais cervejeiros, além de estar em concordância com a legislação brasileira, demonstrando que as cervejas desenvolvidas apresentaram padronização e controle de qualidade adequados e seguros para o consumo. A análise sensorial realizada resultou em boa aceitação para a formulação em que se utilizou levedura não-*Saccharomyces* com aplicação de nutrição adicional para a etapa de fermentação, constatando que a concentração adequada de minerais contribui para melhorar o perfil sensorial das cervejas e diminuir a presença de *off-flavors*.

Assim, a formulação em que se utilizou a espécie de levedura *Torulaspota delbrueckii* com a nutrição adicional foi escolhida como o produto final deste estudo, pois a técnica de brassagem *cold mash* preservou a semelhança com o estilo Pilsen e também conferiu um mosto cervejeiro com menor quantidade de açúcares fermentáveis, e a condição de fermentação utilizada propiciou uma cerveja com complexidade de sabores e aromas, mas classificada como sem álcool, resultando em uma bebida sensorialmente equilibrada e agradável para os futuros consumidores que desejam diminuir o consumo de álcool.

7. REFERÊNCIAS

ADAMENKO, K.; KAWA-RYGIELSKA, J.; KUCHARSKA, A. Z. Characteristics of Cornelian cherry sour non-alcoholic beers brewed with the special yeast *Saccharomyces ludwigii*. **Food Chemistry**. v. 312, 2020.

ALMEIDA, D. S. DE; BELO, R. F. C. Análises físico-químicas de cervejas artesanais e industriais comercializadas em sete Lagoas-mg. **Revista Brasileira de Ciências da Vida**, v. 5, n. 5, p. 1–16, 2017.

ASBC Method of Analysis. American Society of Brewing Chemists. In International Methods; The Society: St Paul, MN, USA; 2018.

BASSO, R. F.; ALCARDE, A. R.; PORTUGAL, C. B. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? **Food Research International**, v. 86, p. 112–120, 2016.

BELLUT, K.; ARENDT, E. K. Chance and Challenge: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 77, p. 77-91, 2019.

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM, 2021. Disponível em: <<https://www.bjcp.org/style/2021/beer/>>. Acesso em: 03 jan. 2024.

BERLINCK, F. Consumo de cerveja sem álcool dispara no Brasil, vira tendência e deve chegar a quase 500 milhões de litros produzidos em 2023. Disponível em: <https://g1.globo.com/saude/noticia/2023/07/30/consumo-de-cerveja-sem-alcool-dispara-no-brasil-vira-tendencia-e-deve-chegar-a-quase-500-milhoes-de-litros-produzidos-em-2023.ghtml>. Acesso em: 19 jan. 2024.

BETTENHAUSEN, H. M.; BARR, L.; BROECKLING, C. D.; CHAPARRO, J. M.; HOLBROOK, C.; SEDIN, D.; HEUBERGER, A. L. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**. v. 113, p. 487-504, 2018.

BINATI, R. L.; MAULE, M.; LUZZINI, G.; MARTELLI, F.; FELIS, G. E.; UGLIANO, M.; TORRIANI, S. From bioprotective effects to diversification of wine aroma: Expanding the knowledge on *Metschnikowia pulcherrima* oenological potential. **Food Research International**, v. 174, p. 113550, 2023.

BLACKMORE, H.; HIDRIO, C.; YEOMANS, M. R. How sensory and hedonic expectations shape perceived properties of regular and non-alcoholic beer. **Food Quality and Preference**, v. 99, 104562, 2022.

BORTOLI, D. A. S.; SANTOS, F.; STOCCO, N. M.; ORELLI JR., A.; TOM, A.; NEME, F. F.; NASCIMENTO, D. D. Leveduras e produção de cervejas – Revisão. **Bionergia em Revista: Diálogos**, v. 1, p. 45-58, 2013.

BOSSAERT, S.; KOCIJAN, T.; WINNE, V.; SCHLICH, J.; HERRERA-MALAVAR, B.; VERSTREPEN, K. J.; OPSTAELE, F. V.; DE ROUCK, G.; CRAUWELS, S.; LIEVENS, B. Beer ethanol and iso- α -acid level affect microbial community establishment and beer chemistry throughout wood maturation of beer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 374, p. 109724, 2022.

BRANYIK, T.; SILVA, D. P.; BASZCZYNSKI, M.; LEHNERT, R.; SILVA, J. B. A. A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. **Journal of Food Engineering**. v. 108, p. 493-506, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Normas para pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução CNS no 196/96 e outras). 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2003. 64 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2019, dezembro 10). Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019. Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, seção 1.

BRUNELLI, L. T.; MANSANO, A. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização Físico-Química de Cervejas Elaboradas com Mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 19–27, 2014.

BUGLASS, A. J. **Handbook of Alcoholic Beverages: Technical, Analytical and Nutritional Aspects**. John Wiley & Sons: West Sussex, 2011.

CANONICO, L.; ZANNINI, E.; CIANI, M.; COMITINI, F. Assessment of non-conventional yeasts with potential probiotic for protein-fortified craft beer production. **LWT**, v. 145, 111361, 2021.

CANONICO, L.; AGARBATI, A.; COMITINI, F.; CIANI, M. Unravelling the potential of non-conventional yeasts and recycled brewers spent grains (BSG) for non-alcoholic and low alcohol beer (NABLAB). **LWT**, v. 190, 115528, 2023.

CAPPELIN, Eliziane. **Cerveja light de baixo teor alcoólico enriquecida com extrato de folhas de oliveira: técnica de cold mashing associada à fermentação interrompida**. 2023, 89 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2023.

CARVALHO, H. H.; JONG, E. V. **Alimentos: Métodos Físicos e Químicos de Análise**. Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul: Rio Grande do Sul, 2002.

CARVALHO, A. A, FINGER, D., MACHADO, C. S., SCHMIDT, E. M, COSTA, P. M., ALVES, A. P. N. N., MORAIS, T. M. F., QUEIROZ, M. G. R., QUINÁIA, S. P., ROSA, M. R., SANTOS, J. M. T., PESSOA, C.; MORAES, M. O., COSTA-LOTUFO, L. V., SAWAYA, A. C. H. F., EBERLIN, M. N., TORRES, Y. R. In vivo antitumoural activity and composition of na oil extract of Brazilian propolis. **Food Chemistry**, v.126, p.1239-1245, 2011.

CARVALHO, D. O.; GUIDO, L. F. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. **Food Chemistry**. v. 372, 131093, 2022. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131093

CELA, N.; GALGANO, F.; PERRETTI, G.; DI CAIRANO, M.; TOLVE, R.; CONDELLI, N. Assessment of brewing attitude of unmalted cereals and pseudocereals for gluten free beer production. **Food Chemistry**, v. 384, 2022.

COELHO NETO, D. M.; FERREIRA, L. L. P.; SAD, C. M. S.; CASTRO, E. V. R.; BORGES, W. S.; FILGUEIRAS, P. R.; LACERDA JR, V. Conceitos Químicos Envolvidos na Produção da Cerveja: Uma Revisão. **Rev. Virtual Quim.**, v. 12, n. 1, 2020.

COSTA, B. P.; PINTO, L. I. F.; ZAMBELLI, R. A.; SOUSA, C. R. V.; MIRANDA, K. W. E.; SANTOS JUNIOR, E. C.; PONTES, D. F.; BASTOS, M. S. R.; LOURENÇO, L. B. V.. Análises Físico-Químicas de Cervejas Artesanais Pale Ale Comercializadas em Fortaleza, Ceará. **Resumos do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Gramado, 2016.

COULIBALY, W. H.; TOHOYESSOU, Y. M. G.; KONAN, P. A. K.; DJÈ, K. M. Bioactive compounds and antioxidant activities of two industrial beers produced in Ivory Coast. **Heliyon**, v. 9, e19168, 2023.

DA SILVA, Marcus Vinicius Bastos. **Efeito da adição de compostos fenólicos sobre o crescimento de levedura etanológica (*saccharomyces sp.*) em meio sintético e em caldo de cana-de-açúcar**. 2013, 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2013.

DA SILVA, R. N. P.; DIAS, J. F.; KOBLITZ, M. G. B. Cervejas: relação entre estilos; compostos fenólicos e capacidade antioxidante. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 3, 2021.

DA SILVA, E.; SURRIBAS, A.; GAMBARI, C.; GRANÈS D.; PIC, L.; BARTHELMEBS, L. Development of a molecular diagnostic test for the specific detection of *Brettanomyces bruxellensis* in red wine. **International Journal of Food Microbiology**, v. 407, p. 110394, 2023.

DALBERTO, Gabriela. **Desenvolvimento e caracterização química e sensorial de cerveja pilsen de baixo teor alcoólico**. 2020, 94 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2020.

DALBERTO, G.; DA ROSA, M. R.; NIEMES, J. P.; LEITE, K.; KUTKOSKI, R. F.; DA ROSA, E. A. Cold Mash in Brewing Process: Optimization of Innovative Method for Low-Alcohol Beer Production. **ACS Food Sci. Technol.**, v. 1, n. 1, p. 374-381, 2021.

DALBERTO, G., NIEMES, J. P., ROSA, M. R. Cold mash in brewer wort with low carbohydrate content: a study of the mashing step. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 26, e2023008, 2023. DOI: 10.1590/1981-6723.00823.

DE FRANCESCO, G., FREEMAN, G., LEE, E., MARCONI, O., PERRETTI, G. Effects of operating conditions during low-alcohol beer production by osmotic distillation. **J. Agric. Food Chem.** v. 62, p. 3279-3286, 2014.

DE FRANCESCO, G.; SANNINO, C.; SILEONI, V.; MARCONI, O.; FILIPPUCCI, S.; TASSELLI, G. & TURCHETTI, B. Mrakia gelida in brewing process: An innovative production of low alcohol. **Food Microbiology**, v. 76, p. 354-362, 2018.

DEL OLMO, A.; BLANCO, C. A.; PALACIO, L.; PRÁDANOS, P.; HERNÁNDEZ, A. Pervaporation methodology for improving alcohol-free beer quality through aroma recovery. **Journal of Food Engineering**. v. 133, p. 1-8, 2014.

DZIEDZIŃSKI, M.; STACHOWIAK, B.; KOBUS-CISOWSKA, J.; KOZŁOWSKI, R.; STUPER-SZABLEWSKA, K.; SZAMBELAN, K.; GÓRNA, B. Supplementation of beer with *Pinus sylvestris* L. shoots extracts and its effect on fermentation, phenolic content, antioxidant activity and sensory profiles. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 63, p. 10-17, 2023.

European Brewery Convention. Analytica – EBC, 5th ed.; Brauerei – und Getränke – Rundschau; Zúrique, 2005.

GABBARDO, Esther Theisen. **Variabilidade do perfil aromático de vinhos Gewürztraminer em função da levedura utilizada na fermentação alcoólica**. 2020. 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

GAETANO, G.; COSTANZO, S.; DI CASTELNUOVO, A.; BADIMON L.; BEJKO, D.; ALKERWI, A.; CHIVA-BLANCH, G.; ESTRUCH, R.; LA VECCHIA, C.; PANICO, S.; POUNIS, G.; SOFI, F.; STRANGES, S.; TREVISAN, M.; URSINI F.; CERLETTI, C.; DONATI, M. B.; IACOVIELLO, L. Effects of moderate beer consumption on health and

disease: A consensus document. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 26, n. 6, p. 443-467, 2016. DOI 10.1016/j.numecd.2016.03.007.

GAMA, E. M., NASCENTES, C. C., MATOS, R. P., RODRIGUES, G. C., RODRIGUES, G. D. A simple method for the multi-elemental analysis of beer using total reflection X-ray fluorescence. **Talanta**, v. 174, p. 277, 2017.

GASIŃSKI, A.; KAWA-RYGIELSKA, J.; PASZKOT, J.; PIETRZAK, W.; SNIĘGOWSKA, J.; SZUMNY, A. Second life of hops: Analysis of beer hopped with hop pellets previously used to dry-hop a beer. **LWT**, v. 159, 113186, 2022.

GASIŃSKI, A.; KAWA-RYGIELSKA, J.; SPYCHAJ, R.; OPIELA, E.; SOWIŃSKI, J. Production of gluten-free beer brewing from sorghum malts mashed without external enzyme preparations. **Journal of Cereal Science**, v. 112, 103693, 2023. DOI: 10.1016/j.jcs.2023.103693

GERNAT, D. C.; PENNING, M. M.; SWINKELS, F. M.; Brouwer, E. R.; Ottens, M. Selective off-flavor reduction by adsorption: A case study in alcohol-free beer. **Food and Bioproducts Processing**, v. 121, p. 91-104, 2020.

GLOPPEN, K. M.; ROESLER, J. S.; FARLEY, D. M. Assessing the Costs of Excessive Alcohol Consumption in Minnesota. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 63, n. 4, p. 8, 2022.

GONÇALVES, R. S.; BITENCOURT, J. F.; JUNQUEIRA, J. R. J.; STAFUSSA, A. P.; BALBINOTI, T. C. V. Biosorption of phenolic compounds and increased bioaccessibility. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.5, p. 34929-34944, 2022.

GONZÁLEZ-SALITRE, L.; GONZÁLEZ-OLIVARES, L. G.; BASILIO-CORTES, U. A. *Humulus lupulus* L. a potential precursor to human health: High hops craft beer. **Food Chemistry**, v. 405, 134959, 2023.

GRAO-CRUCES, E. M.; MONTSERRAT-DE LA PAZ, S.; MARTIN, M. E. Moderate beer consumption and metabolic health: A comprehensive review from the lipoprotein perspective. **Journal of Functional Foods**, v. 95, 105188, 2022.

GRASSI, S.; AMIGO, J. M.; LYNDGAARD, C. B.; FOSCHINO, R.; CASIRAGHI, E. Assessment of the sugars and ethanol development in beer fermentation with FT-IR and multivariate curve resolution models. **Food Research International**. v. 62, p. 602-608, 2014.

GSCHAEDLER, A. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 73–77, 2017.

HE, W.; TIAN, Y.; LIU, S.; VAATERI, L.; MA, X.; HAIKONEN, T.; YANG, B.; LAAKSONEN, O. Comparison of phenolic composition and sensory quality among pear beverages made using *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii*. **Food Chemistry**, 422, 136184, 2023.

HINOJOSA-AVILA, C. R.; GARCÍA-GAMBOA, R.; CHEDRAUI-URREA, J. J. T.; GARCÍA-CAYUELA, T. Exploring the potential of probiotic-enriched beer: Microorganisms, fermentation strategies, sensory attributes, and health implications. **Food Research International**, v. 175, 113717, 2024.

JASOVSKA, P.; RAMMAL, H. G.; RHODES, C.; LOGUE, D. Tapping foreign markets: Construction of legitimacy through market categorization in the internationalizing craft beer industry. **Journal of World Business**, p. 101425, 2023.

JOHANSSON, L.; NIKULIN, J.; JUVONEN, R.; KROGERUS, K.; MAGALHÃES, F.; MIKKELSON, A.; NUPPUNEN-PUPUTTI, M.; SOHLBERG, E.; DE FRANCESCO, G.; PERRETTI, G.; GIBSON, B. Sourdough cultures as reservoirs of maltose-negative yeasts for low-alcohol beer brewing. **Food Microbiology**, v. 94, 103629, 2021.

KANG, Q.; SUN, J.; WANG, B.; SUN, B. Wine, beer and Chinese Baijiu in relation to cardiovascular health: the impact of moderate drinking. **Food Science and Human Wellness**, 12, 1-13, 2023.

KERR, E. D.; CABOCHE, C. H.; SCHULZ, B. L. Posttranslational Modifications Drive Protein Stability to Control the Dynamic Beer Brewing Proteome. **Mol. Cell. Proteomics.**, v. 18, n. 9, p. 1721-1731, 2019.

KOLC, Christiane S. Machado. **Composição química de própolis amarela do Mato Grosso do Sul: Comparação com os tipos de própolis verde, vermelha e marrom**. 2014. 137 f. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2014.

KUTKOSKI, R. F.; CABRERA, L. C.; DA ROSA, M. R.; FELSNER, M. L. Influência do Processamento e da Matéria Prima nas Características Físico-Químicas de Cerveja Lager Produzida em uma Microcervejaria. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 3, p. 720-740, 2019.

LAMIQUIZ-MONEO, I.; GRACIA-RUBIO, I.; PÉREZ-CALAHORRA, S.; BEA, A. M.; FUMARAL, A.; FERRER-MAIRAL, A.; GALINDO-LALANA, C.; PRIETO-MARTÍN, A.; CENARRO, A.; CIVEIRA, F.; MATEO-GALLEGO, R. Effect of Novel Alcohol-Free Beer

Recipes Enriched With Isomaltulose and a Resistant Dextrin on the Metabolic Postprandial Response in Healthy Subjects. **Current Developments in Nutrition**, v. 5, p. 340, 2021.

LEÃO, P. R. P.; MEDINA, A. L.; VIEIRA, M. A.; RIBEIRO, A. S. Beer sample decomposition using a reflux system for the monoelementar determination by FAAS/AES and multielementar determination by MIP OES. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

LIU, T.; XU, C.; DRIBAN, J. B.; MCALIDON, C.; EATON, C. B.; LU, B. Excessive alcohol consumption and the risk of knee osteoarthritis: a prospective study from the Osteoarthritis Initiative. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 30, n. 5, p. 5, 2022.

LIU, J.; WAN, Y.; CHEN, Y.; LI, M.; LIU, N.; LUO, H.; HUANG, D.; PENG, H.; FU, G. Effects of *Torulaspora delbrueckii* on physicochemical properties and volatile flavor compounds of navel orange wine. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 121, 105328, 2023.

MANOUSHI, N.; KABIR, A.; FURTON, K. G.; STATHOGIANNOPOULOU, M.; DROSAKI, E.; ANTHEMIDIS, A. An automatic on-line sol-gel pyridylethylthiopropyl functionalized silica-based sorbent extraction system coupled to flame atomic absorption spectrometry for lead and copper determination in beer samples. **Food Chemistry**, v. 394, 133548, 2022.

MATEO-GALLEGO, R.; PEREZ-CALAHORRA, S.; LAMIQUIZ-MONEO, I.; MARCO-BENEDÍ, V.; BEA, A. M.; FUMANAL, A.J.; PRIETO-MARTÍN, A.; LACLAUSTRA, M.; CENARRO, A. & CIVEIRA, F. Effect of an alcohol-free beer enriched with isomaltulose and a resistant dextrin on insulin resistance in diabetic patients with overweight or obesity. **Clinical Nutrition**, 39, 475-483, 2020.

MIGUEL, G.; CARLSEN, S.; ARNEBORG, N.; SAERENS, S. M. G.; LAULUND, S.; KNUDSEN, G. M. Non-Saccharomyces yeasts for beer production: Insights into safety aspects and considerations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 383, p. 109951, 2022.

MINITAB. **Minitab Incorporation**, USA., 2010.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. 1 ed. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.

MOURA-NUNES, N.; BRITO, T. C.; FONSECA, N. D.; AGUIAR, P. F.; MONTEIRO, M.; PERRONE, D.; TORRES, A. G. Phenolic compounds of Brazilian beers from different types and styles and application of chemometrics for modeling antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 199, 105-113, 2016.

MUTZ, Y. S.; ROSARIO, D.; SILVA, L. R. G.; SANTOS, F. D.; SANTOS, L. P.; JANEGITZ, B. C.; FILGUEIRAS, P. R.; ROMÃO, W.; FERREIRA, R. Q.; CONTE-JUNIOR, C. A. Portable electronic tongue based on screen-printed electrodes coupled with chemometrics for rapid differentiation of Brazilian lager beer. **Food Control**, v. 127, 108163, 2021.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2014.

NEVES, Luis Eduardo Pereira. **Identificação de Compostos Voláteis Associados à Maturação de Cerveja em Madeira**. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologias Química e Biológica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

NIEMES, João Paulo. **Fermentação de diferentes méis, melado de cana e xarope de glicose: acompanhamento do perfil químico, análise do teor de fenólicos e atividade antioxidante**. 2018. 93 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2018.

NIU, C.; HAN, Y.; WANG, J.; ZHENG, F.; LIU, C.; LI, Y.; LI, Q. Malt derived proteins: Effect of protein Z on beer foam stability. **Food Bioscience**, v. 25, p. 21-27, 2018.

NOLASCO, R. X.; ASCÊNCIO, S. D.; BALLIN, F.; SOARES, I. M.; COSTA, O. J.; NAZARENO, J. C. Análise da influência do alumínio e magnésio nos processos fermentativos de resíduos hidrolisados da bananeira para produção de etanol. **Revista em Agronegócio e Meio Ambient**, v. 13, n. 4, p. 1533-1549, 2020.

OSORIO, M.; MORENO, F. L.; HERNÁNDEZ, E.; FILOMENA-AMBROSIO, A.; OSORIO, C.; RUIZ, Y. Effects of progressive freeze concentration on craft beer: Volatile compounds, sensory profile, and physicochemical characteristics. **LWT**, v. 191, 115662, 2024. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115662.

PEREIRA-JUNIOR, Paula C. da Silva. **Estudo da fermentação em co-cultura de leveduras *Saccharomyces* e não-*Saccharomyces* para produção de cervejas**. 2019. 72 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2019.

PERIM, G. A.; DE ANDRADE, M. B.; DOS SANTOS, T. R. T.; MARQUES, R. G. Influência do pH na Cerveja Artesanal. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 261–264, 2013.

PETRÓN, M. J.; ANDRÉS, A. I.; ESTEBAN, G.; TIMÓN, M. L. Study of antioxidant activity and phenolic compounds of extracts obtained from different craft beer by-products. **Journal of Cereal Science**, v. 98, 103162, 2021. DOI: 10.1016/j.jcs.2021.103162.

PILARSKI, D. W.; GEROGIORGIS, D. I. Progress and modelling of cold contact fermentation for alcohol-free beer production: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 273, 2014.

PIRRONE, A.; PRESTIANNI, R.; NASELLI, V.; TODARO, A.; FARINA, V.; TINEBRA, I.; RAFFAELE, G.; BADALAMENTI, N.; MAGGIO, A.; GAGLIO, R.; SETTANNI, L.; BRUNO, M.; MOSCHETTI, G.; ALFONZO, A.; FRANCESCA, N. Influence of indigenous *Hanseniaspora uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* from sugar-rich substrates on the aromatic composition of loquat beer. **International Journal of Food Microbiology**, v. 379, 109868, 2022. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109868.

QUIFER-RADA, P., VALLVERDÚ-QUERALT, A., MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M., CHIVA-BLANCH, G., JÁUREGUI, O., ESTRUCH, R., & LAMUELA-RAVENTÓS, R. A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). **Food Chemistry**, 169, 336–343, 2015.

RAMANAN, M.; FOX, G. P.; MARCO, M. L. Beer for live microbe delivery. **Journal of Functional Foods**, v. 113, 105987, 2024. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105987.

RIU-AUMATELL, M.; MIRÓ, P.; SERRA-CAYUELA, A.; BUXADERAS, S.; LÓPEZ-TAMAMES, E. Assessment of the aroma profiles of low-alcohol beers using HS-SPME-GC-MS. **Food Research International**. v. 57, p. 196-202, 2014.

ROCA-MESA, H.; DELGADO-YUSTE, E.; MAS, A.; TORIJA, M., BELTRAN, G. Importance of micronutrients and organic nitrogen in fermentations with *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 381, 109915, 2022.

ROMERO-RODRÍGUEZ, R.; DURÁN-GUERRERO, E.; CASTRO, R.; DÍAZ, A. B.; LASANTA, C. Evaluation of the influence of the microorganisms involved in the production of beers on their sensory characteristics. **Food and Bioproducts Processing**, v. 135, p. 33–47, 2022.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A Química da Cerveja. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 2, p. 98–105, 2015.

SALES, L. S.; SOUZA, P. G. Produção de cerveja do estilo Catharina Sour com Araçá-Boi (*Eugenia Stipitata* Mcvaugh). **Brazilian Journal of Development**, v.7, n.1, p.1599-16, 2021.

SÁNCHEZ, R. J.; PAREDES, D. A. F.; LAORETANI, D. S.; VILLADA, Y.; FUENTES, M.; ESPINOSA, J. On the conceptual design of the hybrid nanofiltration/distillation process in the production of alcohol-free beers. **Separation and Purification Technology**, v. 267, 118625, 2021.

SANTIAGO, H. Cerveja zero álcool ganha adeptos entre jovens e consumo triplica em 4 anos. Disponível em: <https://economia.uol.com.br/noticias/redacao/2023/07/15/cerveja-zero-alcool-ganha-espaco-publico-jovem.htm>. Acesso em: 19 jan. 2024.

SCARANO, S.; PASCALE, E.; PALLADINO, P.; FRATINI, E.; MINUNNI, M. Determination of fermentable sugars in beer wort by gold nanoparticles@polydopamine: a layer-by-layer approach for Localized Surface Plasmon Resonance measurements at fixed wavelength. *Talanta*. v. 183, p. 24-32, 2018.

SCHÖTTKE, N.; RÖGENER, F. Cold Mashing - Analysis and optimization of extraction processes at low temperatures in the brewing process. **E3S Web Conf**, v. 247, 2021. DOI: 10.1051/e3sconf/202124701036.

SILVA, A. E.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; HERBST JUNIOR, C. G.; HECKTHEUER, L. H. R.; REICHERT, F. S. Elaboração de cerveja com diferentes teores alcoólicos através de processo artesanal. **Alim. Nutr.** v. 20, n. 3, p. 369-374, 2009.

SILVA, L. R. G.; MUTZ, Y. A.; STEFANO, J. S.; CONTE-JUNIOR, C. A.; FERREIRA, R. Q. A simple and reliable electroanalytical method employing a disposable commercial electrode for simultaneous determination of lead (II) and mercury (II) in beer. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 110, 104564, 2022.

SIMONETTI, G. Sem perder o brinde: bebidas não alcoólicas ganham mais espaço e sobem de nível. Disponível em: <https://forbes.com.br/forbeslife/2023/08/drinks-e-cerveja-sem-alcool-sobem-de-nivel/>. Acesso em: 19 jan. 2024.

SOUSA, V. M.; FOGAÇA, L. C. S. Perfil físico-químico de cervejas artesanais e industriais e adequação dos rótulos quanto à sua graduação alcoólica. **Revista Multidisciplinar**, v. 13, n. 43, p. 440-447, 2019.

STAUB, C.; CONTIERO, R.; BOSSHART, N.; SIEGRIST, M. You are what you drink: Stereotypes about consumers of alcoholic and non-alcoholic beer. **Food Quality and Preference**, v. 101, 104633, 2022.

SZOLLOSI, A.; NGUYEN, Q. D.; KOVACS, A. G.; FOGARASI, A. L.; KUN, S.; HEGYESNE-VECSERI, B. Production of low or non-alcoholic beer in microbial fuel cell. **Food and Bioproducts Processing**. v. 98, p. 196-200, 2016.

UDEH, H. O.; KGATLA, T. E. Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 4, p. 19–45, 2013. DOI: 10.5897/JBD2013.0041

VILLACRECES, S.; BLANCO, C. A.; CABALLERO, I. Developments and characteristics of craft beer production processes. **Food Bioscience**, v. 45, p. 101495, 2022.

VRZAL, T.; SLABÝ, M.; KUBIZNIAKOVÁ, P.; HORÁK, T.; OLŠOVSKÁ, J. Sensomic comparison of lager beers fermented by selected *Saccharomyces pastorianus* yeast strains. **Food Microbiology**, v. 115, 104321, 2023. DOI: 10.1016/j.fm.2023.104321

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic substances in beer: Structural diversity, reactive potential and relevance for brewing process and beer quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 4, p. 953-988, 2018.

WYLER, P. **Influência da Madeira de Carvalho na Qualidade da Cerveja**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. **Métodos físico-químicos para análise de Alimentos**, p. 589–625, 2008.

ZHANG, M.; ZHONG, T.; WANG, Z.; DU, M. Effects of inoculation protocols on aroma profiles and quality of plum wine in mixed culture fermentation of *Metschnikowia pulcherrima* with *Saccharomyces cerevisiae*. **LWT**, v. 161, p. 113338, 2022.

ANEXOS

Anexo A: Termo de consentimento entregue aos participantes da análise sensorial.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Prezado(a) Colaborador(a), você está sendo convidado(a) a participar do seguinte estudo:

. **Título da pesquisa:** Análise sensorial de cervejas sem álcool.

. **Pesquisador responsável:** Gabriela Dalberto

. **Instituição a que pertence o pesquisador responsável:** Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO

. **Local de realização do estudo/coleta de dados:** UNICENTRO - Campus Cedeteg

- Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao pesquisador sobre qualquer dúvida que você tiver.

- Caso se sinta esclarecido (a) sobre as informações que estão neste Termo e aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, em duas vias, sendo uma via sua e a outra do pesquisador responsável pela pesquisa.

- Saiba que você tem total direito de não querer participar.

1. OBJETIVO DA PESQUISA: Avaliar sensorialmente a aceitação de cervejas pilsen sem álcool obtidas pela técnica *cold mash*.

2. PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:

Você irá participar desta pesquisa provando diferentes amostras de cervejas sem álcool (até 0,5%) e irá preencher uma ficha de avaliação sensorial, onde irá avaliar cada amostra atribuindo pontuação de 1 a 5 para diferentes aspectos sensoriais das cervejas, sendo eles: aparência, aroma e sabor. Essa forma de avaliação é chamada Perfil de Característica.

Além disso, a ficha sensorial conta com a avaliação das amostras por meio de uma escala numerada de 1 a 7 para a frequência de consumo, sendo: 1 - Nunca consumiria; 2 - Consumiria muito raramente; 3 - Consumiria raramente; 4 - Consumiria ocasionalmente; 5 - Consumiria frequentemente; 6 - Consumiria muito frequentemente; 7 - Consumiria sempre.

Por fim, será solicitado que você preencha um Perfil de Atitude, que é uma avaliação com cinco pontos, onde você atribuirá notas de acordo com a qualidade de cada amostra provada, sendo: 1 - qualidade muito inferior; 2 - qualidade inferior; 3 - qualidade similar; 4 - qualidade superior; 5 - qualidade muito superior. Esse teste indica a aceitabilidade do produto.

Você receberá cerca de 30 mL de cada formulação de cerveja por se tratar de amostras com teor alcoólico entre 0,0 e 0,5%.

Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, tendo você a liberdade de recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, e exigir a retirada de sua participação da pesquisa sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa.

3. LOCAL DA PESQUISA: Será necessário que você compareça a Universidade Estadual do Centro Oeste - Unicentro, Campus CEDETEG, Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Engenharia de Alimentos, para avaliar sensorialmente a aceitação de cervejas pilsen sem álcool e de baixo teor alcoólico, o que pode levar aproximadamente 15 minutos.

4. RISCOS E DESCONFORTOS: Este procedimento apresenta riscos mínimos, porém pode ser nocivo e perigosos para determinados grupos de pessoas, como: pessoas portadoras de diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, doenças do sistema digestivo e para pessoas que já tiveram ou tem problema relacionado ao fígado, doenças neurológicas, psiquiátricas, pessoas que fazem uso contínuo de medicação e ou estão fazendo uso, alérgico a algum tipo de alimento, ou menor de 18 anos. Em caso de pertencer a algum destes grupos, o candidato será impedido de participar acionando os Critérios de Exclusão.

Por mais que ingerida em pequenas quantidades, o álcool pode anular o efeito de medicação, pode causar dependência e pode desencadear alguns efeitos colaterais como: Dor de cabeça, enjoo, mal-estar. Após a participação, o voluntário não deverá e não poderá fazer uso do volante devido ao álcool, pois, com a Lei Seca, quem é flagrado dirigindo após ter ingerido mesmo que uma pequena quantidade, é penalizado. Mesmo que não seja pego em uma blitz, quem bebe e dirige corre o risco de morrer ou matar outras pessoas por falta de reflexo na direção. Não poderá operar máquinas ou exercer qualquer outra função que apresente risco a sua vida. Por conter teor alcoólico mesmo que baixo, entre 0,0 e 2,0%, é necessário lembrar para beber com moderação e não deve dirigir após a análise, e ainda que: "O consumo de álcool inibe os reflexos e reduz a capacidade para dirigir e operar máquinas", "O consumo de álcool pode causar dependência e diversos malefícios à saúde", "O consumo de álcool deve ser evitado durante toda a gravidez e amamentação".

Todas as amostras de cerveja utilizadas nesta análise sensorial passarão por determinação de controle de qualidade utilizando a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, que estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria, bem como determinações descritas em Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos, do Instituto Adolfo Lutz. Amostras que não se mostrem adequadas quanto aos valores padrão reportados pela literatura para os parâmetros de teor alcoólico, pH, acidez total, cor e amargor serão retiradas desta análise.

Se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente da participação no estudo, tem direito a assistência integral, imediata e gratuita (responsabilidade dos pesquisadores) e também tem direito a pleitear indenização, segundo as determinações do Código Civil (Lei nº 10.406 de 2002) e das Resoluções 466/12 e 510/16 do Conselho Nacional de Saúde, caso sinta que houve qualquer tipo de abuso por parte dos pesquisadores.

5. BENEFÍCIOS: Os benefícios esperados com esse estudo são os de apresentar aos consumidores um novo tipo de produto, pois comercialmente não se observa uma cerveja sem álcool que conserve as características encontradas nas cervejas tradicionais, ou seja, que possua sabor, aroma, cor e corpo semelhantes. A cerveja é uma bebida que, se ingerida com cautela e moderação, pode trazer benefícios ao organismo, visto que é rica em vitaminas, polifenóis (antioxidantes), minerais, sendo fonte de nutrientes e fibras. Grande parte desses nutrientes são provenientes do malte, e na composição da cerveja também está o lúpulo, que é uma planta com propriedades antibióticas e anti-inflamatórias. Outro benefício está na menor quantidade de

álcool que esta bebida apresenta por se tratar de cervejas sem álcool, sendo o teor mínimo de 0,0% e máximo de 0,5%, enquanto uma cerveja tradicional possui em torno de 5% de álcool.

6. CONFIDENCIALIDADE: Todas as informações que o(a) Sr.(a) nos fornece ou que sejam conseguidas por questionário serão utilizadas somente para esta pesquisa. Suas respostas, dados pessoais e avaliações ficarão em segredo e o seu nome não aparecerá em lugar nenhum dos questionários. Quando os resultados da pesquisa forem divulgados, isto ocorrerá sob forma codificada, para preservar seu nome e manter sua confidencialidade.

7. DESPESAS/RESSARCIMENTO: Os custos do projeto são de responsabilidade do pesquisador. O colaborador/participante não receberá qualquer valor em dinheiro pela sua participação e as despesas necessárias para a realização da pesquisa não são de sua responsabilidade.

8. MATERIAIS: O material obtido na forma de ficha de avaliação será utilizado unicamente para essa pesquisa e será mantido em arquivo pelo prazo legal de 5 anos, podendo então ser descartado.

Caso você tenha mais dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos, pode nos contatar nos endereços a seguir ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da UNICENTRO, cujo endereço consta deste documento.

O Comitê de Ética, de acordo com a Resolução 466/2012-CNS-MS, é um colegiado interdisciplinar e independente, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses de participantes de pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro dos padrões éticos. Para garantir os padrões éticos da pesquisa, os tópicos anteriores concedem requisitos mínimos para manter sua integridade e dignidade na pesquisa.

* Como segurança jurídica, este termo deverá ser preenchido em **duas vias** de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

* Você poderá entrar em contato com o/a pesquisador/a responsável ou o Comitê de Ética em Pesquisa (COMEP/UNICENTRO), através das informações, endereços e telefones contidos abaixo.

DADOS DO PARECER DE APROVAÇÃO

Emitido Pelo Comitê de Ética em Pesquisa, COMEP-UNICENTRO

Número do parecer: 6.058.983

Data da relatoria: 15/05/2023

Anexo B: Termo de consentimento assinado pelos participantes da análise sensorial.

CONSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu, _____, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e concordo em participar VOLUNTARIAMENTE do projeto de pesquisa, conforme descrito.

Eu, Gabriela Dalberto, pesquisadora responsável, declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto de pesquisa acima descrito

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura do pesquisador responsável

Guarapuava, 14/09/2023

Anexo C: Ficha utilizada nos testes de aceitação da análise sensorial.

Idade: _____ **Sexo:** Feminino () Masculino () **Data:** __/__/_____

Você está recebendo amostras de cerveja pilsen puro malte. Avalie as amostras que você recebeu com relação aos atributos a seguir, sendo escore “1” para “péssimo” e “5” para “excelente”:

Amostra (Código)	_____	_____	_____
ATRIBUTOS	NOTA	NOTA	NOTA
Aparência			
Aroma			
Sabor			

Comentários: _____

Avalie cada uma das amostras codificadas e use a escala abaixo para indicar com qual frequência você consumiria cada uma das amostras.

NOTA	AMOSTRA	NOTA
7 Consumiria sempre		
6 Consumiria muito frequentemente	_____	_____
5 Consumiria frequentemente	_____	_____
4 Consumiria ocasionalmente	_____	_____
3 Consumiria raramente	_____	_____
2 Consumiria muito raramente		
1 Nunca consumiria		

Em comparação com a cerveja que você costuma consumir, avalie cada uma das amostras codificadas. Use a escala abaixo para indicar se as amostras têm qualidade similar, inferior ou superior à da cerveja que você normalmente consome.

	NOTA	AMOSTRA	NOTA
5	Qualidade muito superior	_____	_____
4	Qualidade superior	_____	_____
3	Qualidade similar	_____	_____
2	Qualidade inferior	_____	_____
1	Qualidade muito inferior		

Entre as amostras que você provou, qual a mais parecida e a menos parecida com uma cerveja tradicional?

Amostra

(mais parecida)

Amostra

Amostra

(menos parecida)