

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

MONIQUE FERNANDA HANSEN

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE OXIDAÇÃO EM CERVEJAS TIPO PILSEN

Porto Alegre, 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

MONIQUE FERNANDA HANSEN

AVALIAÇÃO DOS PROCESSOS DE OXIDAÇÃO EM CERVEJAS TIPO PILSEN

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do Curso de Química Industrial, como requisito parcial para obtenção do grau de Químico Industrial.

Prof. Dra. Leandra Franciscato Campo
Orientadora

Porto Alegre, 2011

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à minha orientadora Leandra Franciscato Campo, não só pela orientação durante a execução deste projeto tecnológico, mas pela sua amizade ao longo de toda a graduação que nunca se limitou apenas à rotina acadêmica e foi muito além do espaço físico do Campus do Vale.

Aos meus pais, José Reinaldo e Neusa, por sempre acreditarem na educação e não hesitarem em momento algum em investir nos seus filhos, mesmo que muitas vezes tiveram que deixar alguns sonhos e planos para mais tarde. Pai e mãe, vocês são a minha maior fonte de inspiração, onde sempre recarrego a minha bateria, fazendo com que eu me sinta muito mais forte e capaz de vencer qualquer obstáculo. Ao meu irmão Moisés, pela compreensão das inúmeras vezes que precisei de concentração para estudar e pela parceria de dividir apartamento durante esses longos anos de graduação. Moi, junto com o pai e a mãe, tu é o que eu tenho de mais precioso, a minha família.

Às minhas colegas de graduação que se tornaram verdadeiras amigas: Camila, Gisele, Ana Maria, Priscila e Marluza. Gurias sem vocês teriam sido muito mais difícil, agradeço por toda parceria, amizade e risadas que demos juntas ao longo desses anos. À minha amiga de todas as horas Karine, pelo carinho, cuidado, fidelidade e por ter permitido que eu conhecesse o sentido de uma verdadeira amizade.

Ao meu padrinho científico Fabiano Rodembusch, por todo conhecimento transmitido, pelos conselhos fornecidos e pela convivência durante os três anos como bolsista de Iniciação Científica. Aprendi muito contigo, quem sabe algum dia voltemos a trabalhar juntos.

À Companhia de Bebidas das Américas, por ter permitido que eu aplicasse os conhecimentos adquiridos durante a graduação e pela construção do meu caráter profissional.

Enfim, quero agradecer a todos que contribuíram de alguma forma para que a conclusão deste projeto tecnológico e o término da graduação virassem realidade, pois sozinha nada disso seria possível, ou até seria, mas não faria nenhum sentido.

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	1
2. ESTADO DA ARTE	3
2.1 Processo de elaboração da cerveja	3
2.2 Estabilidade da cerveja	8
3. SITUAÇÃO ATUAL	11
4. OBJETIVOS	12
5. PROPOSTA TECNOLÓGICA	13
6. METODOLOGIA	16
6.1 Descrição da metodologia utilizada	16
6.2 Experimental	17
6.3 Determinações da quantidade de oxigênio dissolvido na cerveja	19
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
7.1 Discussão dos Experimentos	22
7.2 Análise crítica dos revestimentos protetores	25
7.3 Discussão das reações de oxidação envolvidas na deterioração da cerveja: a formação do trans-2-nonenal	26
7.4 A viabilidade econômica da utilização de filmes poliméricos com leveduras imobilizadas	32
7.5 O mercado da cerveja	34
8. CONCLUSÃO CRÍTICA	37
9. BIBLIOGRAFIA	37

LISTA DE TABELAS

1. Tempos de permanência em cada temperatura durante o processo de mosturação_____ 4
2. Comparação das quantidades de oxigênio dissolvido nas garrafas contendo ar saturado de água na presença e ausência das lâminas com levedura imobilizada_____ 22
3. Relação da quantidade de oxigênio dissolvido na cerveja artificial, o teor de massa seca de levedura e o seu número de células viáveis_____ 23
4. Resultados do oxigênio residual presente em garrafas com cerveja artificial, utilizando-se diferentes coberturas à rolha metálica_____ 24
5. Relação da quantidade de levedura empregada nos filmes poliméricos e o custo final dos mesmos_____ 33
6. Custo final da utilização de leveduras nas rolhas metálicas_____ 34
7. Consumo de cerveja no Brasil na última década_____ 35

LISTA DE FIGURAS

1. Estrutura do *trans*-2-nonenal _____ 9
2. Ilustração esquemática de rolha aplicada em embalagem de vidro _____ 15
3. Representação do eletrodo de oxigênio do tipo Clarck _____ 20
4. Relação entre a intensidade de corrente e a concentração de O₂ (para uma voltagem na faixa de 0,4 a 0,7 volts) para um eletrodo de Clarck imerso em solução aquosa _____ 21
5. Velocidade de oxidação de ácidos graxos em função das condições de meio;
1 - Concentração de espécies pró-oxidante baixa; 2 - Concentração de espécies pró-oxidante elevada _____ 28
6. Mecanismo radicalar proposto para a formação do *trans*-2-nonenal a partir da auto-oxidação do ácido linoleico _____ 29
7. Caminho (I) - Mecanismo proposto de adição de O₂ no estado excitado singlete à ligação dupla do ácido linoleico com formação de um monohidroperóxido; Caminho (II) - Monohidroperóxidos formados por foto-oxidação a partir do ácido linoleico _____ 31
8. Estruturas resultantes das ligações entre o sulfito e o *trans*-2-nonenal _____ 32
9. Segmentação do mercado cervejeiro por empresas (abril de 2007) _____ 36

1. APRESENTAÇÃO

A cerveja é considerada uma solução água-etanol com centenas de diferentes moléculas dissolvidas, originadas do processamento das matérias-primas. Porém, uma cerveja recém envasada não está em equilíbrio químico e é por isso que durante o tempo de armazenamento reações de transformações continuam ocorrendo, procurando chegar ao estado de menor energia e máxima entropia¹.

A denominação Pilsener ou Pilsen é originária da cidade de Pilsen na Boêmia, República Tcheca. Este tipo de cerveja foi criada em 1842 nesta região e apresenta coloração clara, de tonalidade dourada brilhante e extrato primitivo que varia de 11 a 13,5%. O motivo pelo qual este projeto tecnológico detém-se ao estudo das cervejas tipo Pilsen é devido ao seu consumo no Brasil representar 98% do mercado, devido principalmente ao clima favorável, uma vez que a principal característica deste tipo de cerveja é o seu baixo teor alcoólico, entre 3 e 5%.

As reações de oxidação parecem ser o principal mecanismo de deterioração do *flavour* da cerveja, e elas começam tão logo termina o processo de fermentação e se tenha perdido o efeito redutor natural das leveduras. Com o passar do tempo haverá desenvolvimento de compostos indesejáveis que estão presentes na cerveja fresca em níveis extremamente baixos ou como precursores. Além do fator tempo, a temperatura elevada também acelera as reações de oxidações, envelhecendo a bebida mais rapidamente².

Para manter a estabilidade dos *flavours* da cerveja por mais tempo, as cervejarias devem selecionar matérias-primas de qualidade, processá-las adequadamente e armazenar o produto final em temperatura baixa³. A oxidação de ácidos graxos a aldeídos está associada com o *off-flavour* (sabor indesejado) de “papelão”. O principal composto que se forma com a oxidação e que transfere à cerveja o *off-flavour* de “papelão” (que os degustadores identificam como sabor oxidado) é o *trans-2-nonenal*. O *trans-2-nonenal* é um aldeído que é determinante na qualidade organoléptica de uma cerveja⁴.

Após a filtração e clarificação, na qual as leveduras são removidas do líquido, a cerveja não está mais protegida e minimizar a exposição ao oxigênio torna-se extremamente importante. No entanto, é muito difícil excluir completamente qualquer contato com o ar entre a fermentação e a máquina que realiza o enchimento.

Normalmente, no momento em que a cerveja clarificada chega ao enchimento, o líquido absorveu entre 0,2 e 0,35 miligramas de oxigênio por litro de líquido (mg / L ou ppm)⁵.

Dependendo da qualidade da máquina de enchimento e de como é realizada esta operação, o *head space* (espaço vazio entre a extremidade superior da garrafa e a altura máxima atingida pelo líquido no interior da mesma) pode adicionar mais 0,2-1,0 mg de oxigênio considerando que no subsequente armazenamento, mais

0,5-5,0 mg de oxigênio pode difundir através do revestimento da rolha de vedação da garrafa⁵.

O presente projeto tecnológico estuda uma solução apresentada na patente referenciada⁵, a qual defende não só a eliminação do oxigênio que foi dissolvido antes do envase, mas também aquele presente no *head space* da garrafa: se a levedura permanecesse viável por um longo período de tempo, inclusive durante a estocagem da cerveja envasada. Os produtos finais do consumo de oxigênio mediado pelas leveduras seria dióxido de carbono e água, ambos compostos usualmente presentes em bebidas.

O estudo da patente mostra que o oxigênio pode ser removido de seus recipientes pasteurizados ou não pasteurizados utilizando leveduras que são imobilizadas como, por exemplo, por encapsulação, em um adequado material sólido, que deve ser situado preferencialmente acima do nível do líquido contido no recipiente. Como resultado deste procedimento de imobilização, as leveduras podem sobreviver a qualquer tratamento de pasteurização enquanto o crescimento dentro do líquido é impedido porque as leveduras não são liberadas em seu interior. Portanto, pelo fato da maioria das bebidas alcoólicas serem meios de crescimento menos adequados, não é permitido que as leveduras se propaguem substancialmente.

A invenção relatada na patente fornece um processo que compreende a imobilização de levedura seca em um material sólido de grau alimentício, o qual permite uma baixa penetração de água. Como resultado, a maioria das leveduras permanecerá essencialmente seca durante a pasteurização no recipiente, mas podem vir a ficar molhadas e, portanto, ativas durante prolongada exposição à atmosfera saturada em vapor de água como existe no *head space* do recipiente fechado.

2. ESTADO DA ARTE

2.1 Processo de elaboração da cerveja

O processo tradicional de produção de cerveja pode ser dividido em oito operações essenciais: moagem do malte; mosturação ou tratamento enzimático do mosto; filtração do mosto; fervura do mosto; tratamento do mosto (remoção do precipitado, resfriamento e aeração); fermentação; maturação e clarificação⁶.

A etapa de moagem do malte tem influência direta sobre a rapidez das transformações físico-químicas, o rendimento, a clarificação e a qualidade do produto final. O objetivo é a redução do grão de malte de modo uniforme, para obter: (1) rompimento da casca no sentido longitudinal, expondo, dessa forma o endosperma, porção interna do grão; (2) a desintegração total do endosperma, promovendo uma melhor atuação enzimática e (3) a produção mínima de farinha com granulometria muito fina, evitando a formação de substâncias que produzem uma quantidade excessiva de pasta dentro da solução. A moagem do malte pode ser conduzida em moinho de rolos em duas etapas, sendo regulados a uma distância de 0,6 mm na primeira etapa, e 0,1 mm na segunda.

A mosturação consiste na mistura do malte moído juntamente com água em temperatura controlada, de acordo com um programa previamente estabelecido. Tem por objetivo solubilizar as substâncias do malte diretamente solúveis em água e, com o auxílio das enzimas, solubilizar as substâncias insolúveis, promovendo a gomificação e posterior hidrólise do amido a açúcares. Nesse sentido, deve-se considerar que todo processo enzimático depende da temperatura, do tempo, da acidez e concentração do meio, da qualidade do malte e da constituição do produto da moagem.

O malte moído é misturado com água (denominada água primária) a 35 °C na proporção de 1:4. A operação é conduzida em tanques de aço inoxidável provido de agitadores, aquecimento, controlador e indicador de temperatura e isolamento térmico. As temperaturas de aquecimento da mistura malte moído e água podem obedecer a seguinte variação como apresentada na Tabela 1. O pH inicial é ajustado em 5,4 pela adição de ácido láctico, e tamponado com CaCl₂ na proporção de 1,26 g/Kg de malte.

Tabela 1. Tempos de permanência em cada temperatura durante o processo de mosturação⁷.

Temperatura (°C)	Tempo de permanência (min)
35	20
45	10
52	10
62	20
72	20
75	5

Ao final da mosturação em 72 °C é realizado teste com solução de iodo 0,2 N a fim de verificar a sacarificação do malte. Após a confirmação da completa hidrólise do amido, pela ausência da coloração roxo-azulada, característica da reação do iodo com o amido (em temperatura ambiente), a solução é aquecida até 75 °C com o objetivo de inativar as enzimas presentes.

A filtração do mosto é realizada em um recipiente denominado *tina de filtração*, construído em aço inoxidável contendo agitador, disco filtrante PAKSCREENS (fundo com ranhuras), bomba centrífuga e isolamento térmico. A casca do malte serve como camada filtrante. Após essa operação, a camada filtrante é lavada com certa quantidade de água (denominada água secundária) à 75 °C, visando aumentar a extração de açúcar e conseqüentemente, elevar o rendimento do processo.

Na etapa seguinte, com o acréscimo de lúpulo, o mosto filtrado é submetido à fervura, visando à inativação de enzimas, esterilização do mosto, coagulação proteica, extração de compostos amargos e aromáticos do lúpulo, formação de substâncias constituintes do aroma e sabor, evaporação de água excedente e de componentes aromáticos indesejáveis ao produto final. A fervura do mosto é realizada em equipamento denominado *fervedor* ou *tina de fervura*, construída em aço inoxidável, encamisada e com sistema de aquecimento e isolamento térmico.

No começo da fervura é acrescentado o lúpulo peletizado em concentrações que variam de 0,4 a 1,4 g/L em relação ao volume inicial de fervura. Quando se utiliza adjunto na forma de açúcar (xarope ou cristalizado), este deve ser acrescentado nesta etapa, na proporção de acordo com a concentração final de açúcar no mosto desejada.

Dependendo da quantidade de lúpulo em pélete que se colocou anteriormente, pode-se fazer o ajuste de amargor adicionando o lúpulo em extrato na concentração desejada em relação ao volume inicial de fervura, além de ácido láctico 96% para ajustar o pH em 4,5 para viabilizar o início da fermentação. O mosto é mantido em fervura até atingir a concentração desejada de açúcar para o início da fermentação, durante 60-90 minutos, permitindo uma evaporação máxima de até 10% do volume inicial.

Após a sua fervura, o mosto deve passar por etapas de retirada do precipitado, resfriamento e posterior aeração. Durante a primeira etapa, fazendo o uso de força centrípeta através da rotação forçada do meio, precipitam-se os complexos de proteínas, resinas e taninos, denominados *trub*, os quais sedimentam no fundo do tanque, sendo separados do mosto límpido.

Posteriormente à retirada do *trub*, o mosto é resfriado em trocador de calor de placas, até a temperatura de fermentação. Mostos podem ser resfriados entre 7 e 22 °C, dependendo do tipo de cerveja que está sendo elaborada. Na linha de mosto frio, à saída do trocador de calor, é injetado oxigênio visando obter uma concentração de oxigênio dissolvido de 20 ppm, no tanque de fermentação.

O processo fermentativo consiste no ponto central para a produção de qualquer bebida alcoólica, possuindo como principal objetivo a conversão de açúcares em etanol e gás carbônico pela levedura, sob condições anaeróbicas. Todos os carboidratos fermentescíveis (maltose, maltotriose, glicose, etc.) são metabolizados pela levedura alcoólica. Além disso, numerosos subprodutos se desenvolvem durante a fermentação, sendo que vários produtos intermediários permanecem no líquido e muitos componentes do mosto são assimilados pela levedura. Todos os compostos envolvidos com a assimilação, formação de produtos e subprodutos, influenciam no aroma, paladar e nas características finais da cerveja pronta.

As leveduras produzem os compostos de aroma e sabor da cerveja como subprodutos de seu metabolismo, sendo que os teores desses compostos variam com os padrões de crescimento celular que são influenciados pelas condições do processo. As características organolépticas da cerveja são influenciadas pelas condições de fermentação, tais como concentração e composição do mosto, temperatura e duração do processo fermentativo.

A principal fonte de nitrogênio existente no mosto para síntese de proteínas, ácidos nucleicos e outros componentes nitrogenados é a variedade de aminoácidos

formados a partir da proteólise das proteínas do malte ocorrida durante o processo de mosturação. O mosto obtido desse processo contém 19 aminoácidos, os quais, sob as condições fermentativas de uma cervejaria, são consumidos pelas leveduras de uma maneira ordenada, sendo diferentes aminoácidos removidos em vários estágios do ciclo fermentativo.

O oxigênio fornecido na aeração do mosto antes da inoculação é consumido pela levedura geralmente em poucas horas e utilizado para produzir ácidos carboxílicos insaturados e esteróis que são essenciais para a síntese da membrana celular e, conseqüentemente, para o crescimento celular, o qual ficaria restrito na ausência desse oxigênio inicial causando fermentação anormal e mudanças nas características organolépticas da cerveja.

A fermentação é condizida em fermentador provido de controlador e indicador de temperatura, manômetro para indicação da pressão interna, para a monitoração do dióxido de carbono formado durante o processo fermentativo.

A maturação (fermentação secundária) é necessária e importante, mas poucas mudanças ocorrem durante este estágio. Entretanto, no processo tradicional de fabricação de cerveja, a fermentação secundária transcorre durante um longo tempo chegando há algumas semanas e até mesmo meses em determinados tipos de cerveja. Um composto chave na maturação é o diacetil(2,3-butadiona) que também é formado como um subproduto na fermentação principal. O diacetil(2,3-butadiona) e a 2,3-pentadiona são hoje os principais produtos pesquisados no processo fermentativo de cerveja. As dicetonas são produzidas e depois reduzidas pela levedura durante a fermentação e maturação. Também podem ser produzidas por bactérias durante e após a fermentação. Essas dicetonas possuem um sabor característico semelhante ao da manteiga, que é agradável a baixas concentrações, mas se torna agressivo em concentrações maiores.

No processo de maturação a cerveja é armazenada ou permanece em tanques a baixas temperaturas, possibilitando o desenvolvimento das características organolépticas finais do produto. O processo também proporciona a clarificação pela precipitação de leveduras e proteínas, assim como sólidos insolúveis. Ocorrem também alterações químicas que auxiliam a clarificação e melhoram o aroma e sabor.

Após a maturação, a cerveja contém leveduras, partículas coloidais dos complexos proteínas-polifenóis e outras substâncias insolúveis formadas, devido ao

baixo pH existente e às baixas temperaturas utilizadas para esta etapa. Portanto, para se obter um produto brilhante e límpido é necessária uma etapa de clarificação que permita remover este material insolúvel. Esta operação pode ser realizada por quatro técnicas básicas tanto individualmente ou em combinação, são elas: sedimentação por gravidade, uso de agentes clarificantes, centrifugação e filtração.

O dióxido de carbono é um constituinte muito importante da cerveja, responsável pela efervescência e a sensação de acidez deixada na boca devido às suas propriedades de gás ácido. Por essa razão, sua concentração na cerveja deve ser cuidadosamente controlada de forma a assegurar que os consumidores possam beber um produto de qualidade. A carbonatação pode ser realizada pela injeção de CO₂ em linha ou em tanque.

O envase é o procedimento de engarrafamento, enlatamento ou embarrilamento do produto e é a etapa mais dispendiosa em uma cervejaria, em termos de matérias-primas e mão de obra. Esta operação é realizada em um equipamento denominado enchedora. Na operação de enchimento, a cerveja filtrada proveniente dos tanques de pressão (tanques pressurizados que mantêm uma contrapressão de 12 a 15 psi) é transferida primeiramente para outro tanque de recepção localizado dentro da enchedora. As enchedoras de garrafas, por exemplo, são máquinas baseadas no princípio de carrossel rotatório, onde as garrafas são transportadas em esteiras e sequencialmente posicionadas sob as cabeças de enchimento livres (cada uma delas contém um tubo de enchimento). Após a aplicação de um selo hermético e retirada do ar mediante um sistema de vácuo, dá-se início a etapa de enchimento. No começo desta etapa é aplicada uma contrapressão com dióxido de carbono antes que o líquido desça por gravidade desde o tanque de recepção da enchedora até as garrafas. A enchedora é ajustada automaticamente de tal forma que o volume desejado de cerveja seja introduzido em cada embalagem. A garrafa cheia é liberada da cabeça de enchimento com o alívio da pressão interna. Durante o transporte para a tampadora é necessário eliminar o ar do espaço vazio (headspace) das garrafas para evitar a subsequente oxidação da cerveja. Esse processo é atualmente realizado pelo jateamento com água onde água esterilizada em alta pressão é jateada sob cada garrafa aberta (apenas pouquíssima quantidade de água entra na garrafa causando uma intensa formação de espuma que ascende pelo gargalo e expelle o oxigênio, prevenindo sua entrada posterior).

Após o enchimento as garrafas são arrolhadas e transportadas até o pasteurizador de túnel. Finalmente, as garrafas encontram-se prontas para etiquetagem, empacotamento e armazenagem.

2.2 Estabilidade da cerveja

O sabor da cerveja é determinado pela matéria-prima, pelo tipo de processo e pela levedura utilizados, além dos compostos produzidos durante a fermentação e maturação, que exercem maior impacto. Entre os compostos produzidos pela levedura, que influenciam marcadamente o *flavour* da cerveja obtida, encontram-se álcoois, ésteres, ácidos orgânicos, compostos carbonilados e compostos sulfurados⁸.

Ao iniciar-se a maturação, a maior parte dos açúcares foi metabolizada em etanol, gás carbônico, glicerol, ácidos orgânicos e álcoois superiores. Durante o processo de maturação, ocorrem algumas alterações de grande importância para a qualidade da cerveja, como o gás carbônico produzido durante a fermentação do extrato restante provoca a carbonatação da cerveja e é suficiente para fornecer à cerveja o teor ideal de carbonatação, e se não alcançado, pode ser corrigido após a filtração; o repouso à baixa temperatura provoca a precipitação dos resíduos de leveduras que ainda permanecem na cerveja; maturação do sabor pelas transformações que ocorrem na concentração de ácido sulfídrico, de acetaldeído e de diacetil(2,3-butadiona), os quais são minimizados durante o processo. Os álcoois superiores e ácidos graxos que se formam durante a fermentação não se modificam significativamente no decorrer da maturação. Durante o período de maturação são formados ésteres dando origem a aroma e sabor que caracterizam a cerveja; entre os ésteres, predominam o acetato de etila, acetato de isoamila, caproato de etila e caprilato de etila⁸.

Um dos objetivos da maturação é manter a cerveja no estado reduzido, evitando que ocorram oxidações que comprometam sensorialmente a bebida. Como a maioria dos alimentos e bebidas, a cerveja não tem uma estabilidade ilimitada. As reações de oxidação parecem ser o principal mecanismo de deterioração do *flavour* da cerveja, e elas começam tão logo termina o processo de fermentação e se tenha perdido o efeito redutor natural das leveduras. Com o passar do tempo haverá desenvolvimento de compostos indesejáveis que estão presentes na cerveja fresca

em níveis extremamente baixos ou como precursores. Além do fator tempo, a temperatura elevada também acelera as reações de oxidações, envelhecendo a bebida mais rapidamente².

O principal composto que se forma com a oxidação e que transfere à cerveja o *off-flavour* de “papelão” é o *trans*-2-nonenal. O *trans*-2-nonenal é um acetaldeído (cuja estrutura está apresentada na Figura 1) que é determinante na qualidade organoléptica de uma cerveja⁴.

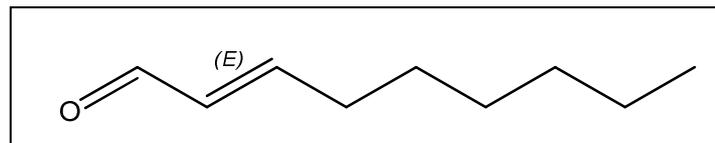


Figura 1. Estrutura do *trans*-2-nonenal.

Além do antioxidante produzido naturalmente pela fermentação, a indústria cervejeira costuma adicionar outros antioxidantes que irão inibir os efeitos negativos dos compostos oxidantes, em particular o oxigênio, evitando reações responsáveis pelas alterações nas características organolépticas da cerveja, ou ainda se ligando aos compostos formados pela oxidação formando um composto inativo organolepticamente. Os antioxidantes mais comumente usados são os ascorbatos e os sulfitos⁴.

Os compostos carbonílicos, particularmente os aldeídos, possuem princípios de detecção muito baixos, o que é um fator muito importante na deterioração do sabor da cerveja durante o armazenamento. A produção de carbonilas está associada normalmente com os armazenamentos prolongados, mas em certos casos podem produzir níveis já detectáveis antes que a cerveja seja liberada da cervejaria⁹. Existem várias reações que formam os compostos carbonílicos, dentre elas, pode-se dizer que as principais são: oxidação de álcoois a aldeídos; autooxidação dos ácidos graxos; degradação enzimática dos lipídeos; autooxidação secundária de aldeídos insaturados de cadeia longa.

Como se pode observar, todas as reações citadas anteriormente só ocorrem devido à presença do oxigênio. O oxigênio é um ponto importante, especialmente na cerveja envasada, já que promove algumas reações e acelera outras. Os radicais livres estão envolvidos nestas reações, em particular o radical hidroxila¹⁰.

O trans-2-nonenal (aldeído de cadeia longa) que produz um sabor e aroma de papelão, é considerado como a carbonila simples mais importante na deterioração da cerveja. É formado pela degradação de um precursor, o ácido trihidroxioctadecanóico, que se forma na oxidação dos ácidos graxos insaturados C₁₈, especialmente do ácido linoleico. A degradação do ácido trihidroxioctadecanóico é acelerada pelas altas temperaturas, pela exposição à luz e pela presença de íons metálicos¹⁰.

A cerveja com elevado conteúdo de oxigênio apresenta um nível de carbonilas notavelmente maior. Entre eles estão o trans-2-nonenal, octanal, iso-butenol e 2-fenilacetaldeído. Existe uma relação clara entre o aparecimento de aromas como consequência das oxidações e a concentração de precursores no mosto e na cerveja, que até certo grau podem ser controlados mediante a aplicação de bons métodos de fabricação da cerveja¹⁰.

O gênero *Saccharomyces* apresenta várias cepas consideradas seguras e capazes de produzir dois metabólitos primários importantes, etanol e dióxido de carbono. Atualmente, taxonomistas (quem estuda taxonomia, que é a parte da biologia que identifica, nomeia e classifica os seres vivos) de leveduras têm designado todas as cepas empregadas na produção de cerveja à espécie *S. Cerevisiae*¹¹.

As características de sabor e aroma de qualquer cerveja estão determinadas de forma preponderante pelo tipo de levedura utilizada. Embora o etanol seja o principal produto de excreção produzido pela levedura durante a fermentação do mosto, este álcool primário tem pequeno impacto no sabor da cerveja. O tipo e a concentração de vários outros produtos de excreção formados durante a fermentação são quem primariamente determinam o sabor da cerveja. Sua formação depende do balanço metabólico global do cultivo da levedura. Vários fatores podem afetar esse balanço e consequentemente o sabor da cerveja, incluindo a cepa da levedura, a temperatura e o pH de fermentação, o tipo e a proporção de adjunto (fonte não maltada de açúcares fermentescíveis), o modelo do fermentador e a concentração do mosto¹¹.

3. SITUAÇÃO ATUAL

Apesar de muitos anos de estudo, ainda não há um consenso sobre a origem dos compostos que causam os *off-flavours* na cerveja, principalmente o de “papelão”, que em menor intensidade pode ser caracterizado como “grão/palha”. Porém, a maioria deles acredita que o envelhecimento da cerveja pode ser atribuído à oxidação de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoléico¹².

Uma quantidade excessiva de oxigênio pode causar uma rápida mudança no aroma e no sabor do produto. Nos últimos anos ficou evidente que os níveis de oxigênio durante todo o processamento podem afetar a vida de prateleira da cerveja¹. Também durante o período de armazenamento a maior parte das mudanças químicas que ocorrem envolvem o oxigênio, portanto serão aceleradas se houver contato com oxigênio depois da etapa de fermentação. Porém, apesar de se cuidar para que a cerveja não incorpore oxigênio depois da fermentação, elas acabam envelhecendo, o que nos remete ao fato já descrito de que a formação de precursores ou até mesmo do *trans-2-nonenal* pode ocorrer já nas primeiras etapas de fabricação da cerveja¹².

Na cerveja com alto conteúdo de oxigênio, o *trans-2-nonenal* degrada-se posteriormente a outros compostos de natureza desconhecida e que também participam no sabor¹⁰. Apesar de que se pode conseguir certo grau de proteção reduzindo o conteúdo de oxigênio da cerveja envasada, nas etapas iniciais da elaboração da cerveja pode ocorrer uma oxidação intensa que provoca uma instabilidade no sabor da cerveja. A oxidação do mosto, por exemplo, diminui a concentração dos compostos redutores e a capacidade redutora dos polifenóis¹⁰.

Após a filtração e clarificação, na qual as leveduras são removidas do líquido, a cerveja não está mais protegida e minimizar a exposição ao oxigênio torna-se extremamente importante. No entanto, é muito difícil excluir completamente qualquer contato com o ar entre a fermentação e a máquina que realiza o enchimento. Normalmente, no momento em que a cerveja clarificada chega ao enchimento, o líquido absorveu entre 0,2 e 0,35 miligramas de oxigênio por litro de líquido (mg / L ou ppm). Dependendo da qualidade da máquina de enchimento e de como é realizada esta operação, o *head space* (espaço vazio entre a extremidade superior da garrafa e a altura máxima atingida pelo líquido no interior da mesma) pode adicionar mais 0,2-1,0 mg de oxigênio considerando que no subsequente

armazenamento, mais 0,5-5,0 mg de oxigênio pode difundir através do revestimento da rolha de vedação da garrafa.

Logo, a eliminação do oxigênio da cerveja recém envasada é um desafio muito grande, uma vez que terminada a fermentação não ocorrerá mais o consumo do oxigênio pelas leveduras, mas sim um acréscimo do mesmo em várias etapas subseqüentes. Uma medida preventiva que já é largamente utilizada pelas indústrias cervejeiras, são os oxímetros *in line*. Estes equipamentos possuem um sensor extremamente sensível que detecta e quantifica o oxigênio que está passando pela tubulação em direção à máquina de enchimento. Como medida de segurança para garantir que altos teores de oxigênio não sejam incorporados, estes equipamentos são intertravados com a máquina de enchimento, a fim de que a mesma cesse sua operação quando o sensor detectar níveis alarmantes de oxigênio.

No entanto, mesmo travando o processo de enchimento e corrigindo as anomalias que levaram ao acréscimo de oxigênio, ainda tem-se o efeito da incorporação pelo *head space* e através da rolha metálica. Por isso, entende-se que para ser possível controlar o envelhecimento da cerveja pela diminuição dos teores de oxigênio, além de se ter um processo de fabricação extremamente controlado, ainda deveria ser possível continuar eliminando o oxigênio da cerveja fresca recém envasada, desafio que é apresentado neste projeto tecnológico, a partir do estudo teórico de uma patente que traz uma inovação para eliminação do oxigênio da cerveja, mesmo após o envase.

4. OBJETIVOS

O presente projeto tecnológico detém-se ao estudo da proposta defendida em uma patente⁵ que trata da imobilização de leveduras em material sólido adequado inserido no interior da rolha metálica, permitindo que as mesmas continuem viáveis mesmo após o envase, sendo que os produtos do consumo de oxigênio seriam gás carbônico e água, dois constituintes naturalmente presentes na cerveja.

5. PROPOSTA TECNOLÓGICA

A proposta defendida por este projeto tecnológico baseia-se no estudo da aplicabilidade de leveduras imobilizadas no interior de rolhas metálicas, com o intuito de eliminar o oxigênio após o envase da cerveja ainda fresca, aumentando a sua vida de prateleira e diminuindo as indesejáveis reações de oxidação que continuam ocorrendo devido à instabilidade do produto e busca pelo equilíbrio químico.

Esta solução, se aplicada, elimina não apenas o oxigênio que foi dissolvido antes do envase, mas também aquele presente no *head space* da garrafa: se a levedura permanecesse viável por um longo período de tempo, inclusive durante a estocagem da cerveja envasada. Os produtos finais do consumo de oxigênio mediado pelas leveduras seria dióxido de carbono e água, ambos compostos usualmente presentes em bebidas.

Embora a transferência de levedura para as garrafas de bebidas proporcionaria uma solução natural e elegante para o problema da oxidação do sabor, esta solução teria, se aplicada como tal, dois grandes inconvenientes. Primeiramente, a introdução de leveduras em bebidas, mesmo que em pequenas quantidades, pode resultar em crescimento da fermentação que, em última instância, pode tornar bebidas originalmente claras em líquidos turvos não atraentes. Por segundo, muitas bebidas são aquecidas até temperaturas em torno de 60 °C como, por exemplo, na pasteurização após o enchimento. Esta pasteurização está incluída no procedimento de engarrafamento a fim de matar microorganismos como bactérias, leveduras e formas para que a contaminação microbiológica da bebida seja impedida. Esta pasteurização pode suprimir toda a atividade de consumo do oxigênio daquelas leveduras que foram introduzidas para prevenir os danos que a oxidação causa ao sabor da cerveja.

No entanto, a invenção supera esses problemas, fornecendo um processo em que a levedura é introduzida no recipiente para remover o oxigênio de tal forma que ela não tem permissão para se propagar substancialmente, pois as leveduras viáveis não estão em contato direto com a bebida. Vantajosamente, a levedura é imobilizada em um material sólido que permite apenas uma baixa penetração de água para a levedura. Quando a levedura ainda está imobilizada em uma condição

seca, o recipiente contendo o líquido pode ser pasteurizado sem perder substancialmente toda a atividade da levedura.

Muitas leveduras são conhecidas por suportar temperaturas bem acima de 65 °C (temperatura aproximada da pasteurização) desde que contenham uma pequena porcentagem de água. Portanto, para sobreviver ao procedimento de pasteurização, a levedura deve ser substancialmente seca, considerando que após a pasteurização o molhamento da levedura é essencial para tornar ativo e iniciar o consumo de oxigênio. Então, mais particularmente, a invenção sugerida fornece um processo que compreende na imobilização de levedura seca em um material sólido de grau alimentício, o qual permite uma baixa penetração de água. Como resultado, a maioria das leveduras permanecerá essencialmente seca durante a pasteurização no recipiente, mas podem vir a ficar molhadas e, portanto, ativas durante prolongada exposição à atmosfera saturada em vapor de água como existe no *head space* do recipiente fechado.

O oxigênio pode ser removido de seus recipientes pasteurizados ou não pasteurizados utilizando leveduras que são imobilizadas como, por exemplo, por encapsulação, em um adequado material sólido, que deve ser situado preferencialmente acima do nível do líquido contido no recipiente (acima do *head space*). Como resultado deste procedimento de imobilização, as leveduras podem sobreviver a qualquer tratamento de pasteurização enquanto o crescimento dentro do líquido é impedido porque as leveduras não são liberadas em seu interior. Portanto, pelo fato da maioria das bebidas alcoólicas serem meios de crescimento menos adequados, não é permitido que as leveduras se propaguem substancialmente.

Para isso, o material utilizado na imobilização das leveduras deve não só ser aceitável para o uso em contato direto com bebidas e produtos alimentares de consumo humano (escala alimentícia), mas também precisa ter outros atributos, propriedades aceitáveis a respeito da permeabilidade para oxigênio, dióxido de carbono e água. Além disso, em elevadas temperaturas (para ser aplicado durante a pasteurização dos recipientes) não deve afetar as propriedades físicas do material, medida em que a permeabilidade ou caráter sólido é alterado.

Materiais adequados para a imobilização de leveduras são, por exemplo, específicos tipos de graxas e polímeros como a parafina ou suas misturas opcionalmente misturadas com seus beneficiadores (melhoradores). Os

melhoradores são agentes para melhorar a ligação do material de imobilização com a superfície do suporte. Graxas e polímeros adequados podem fundir entre 70 e 140 °C. Preferencialmente a faixa de temperatura de fusão deve ser na faixa de 80 a 100 °C. Estes materiais podem ser vantajosamente usados como uma camada fina ou filme contendo as leveduras em contato com a bebida ou, preferencialmente, este filme situa-se acima do líquido e está em contato apenas com os gases e vapores contidos no *head space*.

As rolhas metálicas, responsáveis pela vedação das garrafas de cerveja, contém em seu interior um material plástico vedante e é neste material que se propõem imobilizar as leveduras. Segundo o Boletim de Tecnologia e Desenvolvimento de Embalagens do CETEA (Centro de Tecnologia de Embalagem), este sistema de fechamento de embalagens de vidro retornáveis é feito por rolhas metálicas tipo coroa (“crown”) ou rolha “pry off”. Este tipo de tampa é fabricado por meio de processo de estampagem de uma folha metálica, seguido de corte. Com base na norma ABNT NBR11134 (1983) a rolha metálica tipo coroa é definida como um conjunto formado por uma cápsula metálica e um disco de vedação plástico interno, possuindo um total de 21 corrugações (cada uma das dobras moldadas na lateral da tampa) com características dimensionais semelhantes, conforme mostra a Figura 2.

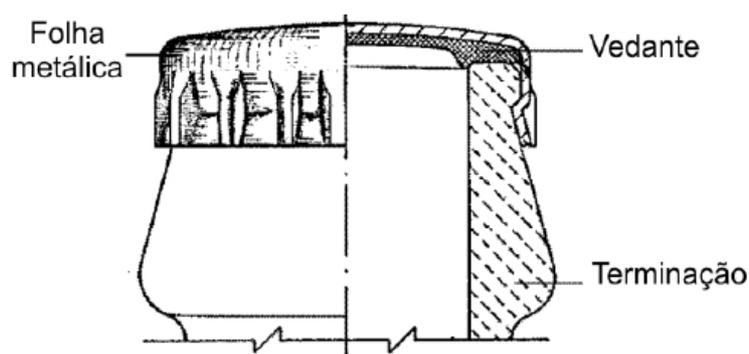


Figura 2. Ilustração esquemática de rolha aplicada em embalagem de vidro.

Fonte: <http://www.manualdepericias.com.br/abnt/NBR11134.asp>.

6. METODOLOGIA

6.1 Descrição da metodologia utilizada

Durante o desenvolvimento da pesquisa que sustenta este projeto, a invenção tecnológica citada na patente já anteriormente referida, se tornou um grande atrativo na busca por alternativas para solucionar a indesejável presença de oxigênio em cervejas, sendo a metodologia descrita por estes autores que será relatada, comentada e discutida nos próximos parágrafos.

Como já citado no desenvolvimento da proposta tecnológica, a invenção baseia-se na imobilização de leveduras em um material sólido propício para contato com os alimentos e que possua propriedades tal para garantir a proteção da levedura imobilizada, para que a mesma possa continuar ativa mesmo após o envase da cerveja e desempenhar seu papel metabólico de consumir o oxigênio e transformá-lo em gás carbônico e água, constituintes naturalmente presentes no produto final.

A imobilização se dá da seguinte forma: leveduras secas (mais que 92% da matéria seca, mas preferencialmente de 94-96%) são misturadas com o material de imobilização fundido para formar uma pasta, a qual é fixada no interior da rolha metálica com a qual o recipiente contendo a cerveja vai ser hermeticamente fechado. Preferencialmente a mistura de levedura seca e o material imobilizador fundido são aplicados dentro de um curto tempo (entre um minuto). Um curto tempo é preferido com o objetivo de prevenir a morte substancial das células das leveduras.

Hoje em dia garrafas são fechadas usando rolhas tipo coroa contendo um revestimento de polímero como, por exemplo, policloreto de vinila (PVC) ou polietileno (PE) no seu interior (Figura 2). A mistura com as leveduras e material de incorporação pode ser dosada e aplicada para este revestimento tendo uma camada com uma espessura entre 5-500 micrometros, com melhores resultados entre 10-200 micrometros, podendo então ser associadas dentro das rolhas tipo coroa. Tais camadas devem conter 0,01-40 miligramas (preferencialmente entre 1 e 10 miligramas) de levedura seca por centímetro quadrado de revestimento. As leveduras que podem ser usadas de acordo com esta invenção são, por exemplo,

todas as leveduras pertencentes aos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Schizosaccharomyces*.

6.2 Experimental

Abaixo, descreve-se individualmente cada experimento citado e utilizado pelos autores da patente:

Experimento 1

Uma mistura de parafina fundida e levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*, 96% da matéria seca) contendo 70 miligramas (mg) por mililitro (mL) de parafina foi preparada pela mistura dos dois componentes sob temperatura de 95 °C. Um mL da mistura quente foi utilizado para cobrir uma lâmina de vidro limpa, com uma camada de 0,1 milímetros (mm) de espessura, contendo aproximadamente 7 mg de levedura por centímetro quadrado. Após a solidificação da camada, as lâminas foram aquecidas por 10 minutos a 65 °C em atmosfera saturada com água, contida em uma garrafa de 350 mL. As lâminas contendo uma superfície coberta de cera de 10 cm² foram então resfriadas. As garrafas foram então fechadas com uma tampa revestida por gordura e incubadas por 14 dias a 30 °C. Garrafas contendo iguais quantidades de ar saturado de água, mas sem as lâminas foram usadas como “branco” do experimento. Depois da incubação, o oxigênio contido em toda a garrafa foi determinado após a sua abertura utilizando um equipamento chamado Solomat 2008 oxigênio Modumeter, equipado com um eletrodo de oxigênio Clarck. O equilíbrio foi usualmente obtido dentro de um minuto.

Experimento 2

Parafina do mesmo tipo utilizada no Experimento 1 foi fundida, misturada com diferentes quantidades de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*, 92% da matéria seca), vertida em um molde com volume total de 20 cm³ e depois se deixou a mistura solidificar. Quantidades de levedura e parafina foram calculadas de tal forma que dois diferentes blocos contendo cada 2 ou 5 gramas de levedura por cm³ foram obtidos. Do bloco contendo 2 gramas de levedura por cm³, fatias de 0,25 mm

de espessura foram cortadas, enquanto que do outro bloco (5 gramas de levedura por cm^3), fatias de 0,10 mm de espessura foram cortadas. Como todas as seções possuem 2 centímetros por 2 centímetros, cada fatia individual contém 10 mg de levedura. Estas fatias foram então fixadas em uma tampa de vidro (usando graxa de silicone). O efeito de rolhas tipo coroa contendo diferentes quantidades de levedura imobilizada foi simulado.

Para testar o sistema, garrafas com capacidade total de 355 mL foram preenchidas com 300 mL de cerveja artificial. A composição (por litro) da cerveja artificial é como segue: 52 mL de etanol (96%); 30 g de dextrina; 150 mg de glicerol; 480 mg de cloreto de potássio; 700 mg de dihidrogenofosfato de sódio; 140 mg de cloreto de cálcio; 250 mg de sulfato de magnésio; 3 g de albumina de soro bovino (a qual foi adicionada como ingrediente final). Água foi adicionada para completar o volume até 1 litro e o pH foi ajustado até 4,0, utilizando ácido clorídrico. A cerveja artificial foi utilizada para evitar o consumo do oxigênio pelos componentes da cerveja. Antes de fechar as garrafas com tampas de vidro preparadas conforme descrito acima, um *head space* de 55 mm de ar foi injetado acima do líquido, utilizando para isso gás carbônico e então a tampa foi colocada imediatamente.

A pasteurização de garrafas contendo cerveja artificial e diferentes camadas de levedura imobilizada foi simulada por imersão das garrafas em um banho-maria de 65 °C. O conteúdo das garrafas foi mantido a 65 °C por 20 minutos (a temperatura exata do conteúdo foi medida em uma garrafa de controle separada) e depois cada garrafa foi colocada em uma incubadora a 30 °C. Após 7 dias de incubação, a quantidade de oxigênio dissolvido em cada garrafa contendo cerveja artificial foi medida conforme descrito no *Experimento 1*.

Experimento 3

Cera foi pulverizada e misturada intensivamente com levedura seca em pó (*Saccharomyces cerevisiae*, 96% da matéria seca) em uma relação de massa de 20 gramas de cera para cada 3 gramas de levedura. Quantidades de 40 ou 80 miligramas desta mistura foram aplicadas no centro das rolhas tipo coroa munidas de cobertura de polietileno. A mistura foi fundida por aquecimento local na cobertura da rolha, não excedendo 95 °C, criando assim uma camada plana de cera-levedura.

Garrafas de cerveja foram preenchidas com 350 mL da cerveja artificial com composição similar à descrita no *Experimento 2*, as quais tinham sido previamente de-oxigenadas por um jato de gás nitrogênio. Subsequentemente as rolhas foram fixadas o mais rápido possível com o auxílio de um dispositivo de nivelamento utilizado em indústrias cervejeiras. É estimado que o procedimento de arrolhamento (fixação da rolha) incrementa um conteúdo inicial de oxigênio de 0,5 a 1,5 ppm em média.

As garrafas foram pasteurizadas durante 20 minutos sob temperatura de 65 °C, seguindo o mesmo caminho citado no *Experimento 2*. Após resfriadas, no entanto, as garrafas foram colocadas na incubadora na temperatura de 20 °C, simulando a temperatura do local de estocagem. A determinação do conteúdo de oxigênio na cerveja artificial ao longo do tempo, após abertas as garrafas, foi realizada pelo método já citado no *Experimento 1*.

6.3 Determinações da quantidade de oxigênio dissolvido na cerveja

Método Polarográfico – Eletrodo de oxigênio tipo Clarck

Qualquer tipo de medição que envolva a eletrorredução (ou eletroxidação) de substâncias em solução constitui uma medição polarográfica. O método consiste na aplicação de uma determinada voltagem entre dois eletrodos que leva à geração de uma corrente de baixa intensidade. Para determinados valores de voltagem a substância em solução é reduzida (ou oxidada) rapidamente quando chega ao eletrodo e a corrente gerada fica apenas limitada pela velocidade de difusão do composto em solução para o eletrodo. Esta corrente é diretamente proporcional à concentração do composto em solução. A medição de oxigênio em solução pode efetuar-se por intermédio de vários tipos de eletrodos. No entanto, o eletrodo de oxigênio do tipo Clarck (elctrodo de Clarck) revelou-se o mais eficiente e o de maior sucesso em diversificados estudos de natureza biológica.

O sistema consiste num eletrodo de platina (cátodo) e num eletrodo de referência de prata (ânodo) imersos numa solução de cloreto de potássio (eletrólito). Uma fina membrana isolante de teflon ou polietileno, permeável ao oxigênio, isola eletricamente a solução a analisar e impede a deposição de substâncias susceptíveis a alterar a resposta dos elementos ativos do sistema. A membrana é

fixa à base por um pequeno anel de borracha de modo a ficar perfeitamente aderente e em estreito contato com os eletrodos (Figura 3). Quando se polariza negativamente o eletrodo de platina em relação ao eletrodo de referência, o oxigênio dissolvido em solução sofre uma redução eletrolítica ao nível do cátodo, gerando-se uma corrente elétrica de baixa intensidade. Na gama de voltagens de polarização, entre $-0,4$ e $-0,7$ volts, a corrente elétrica varia linearmente com a concentração de oxigênio (Figura 4). O método de medição de oxigênio em solução baseia-se assim nesta observação empírica que relaciona linearmente a corrente gerada pelo eletrodo com a concentração de oxigênio em solução.

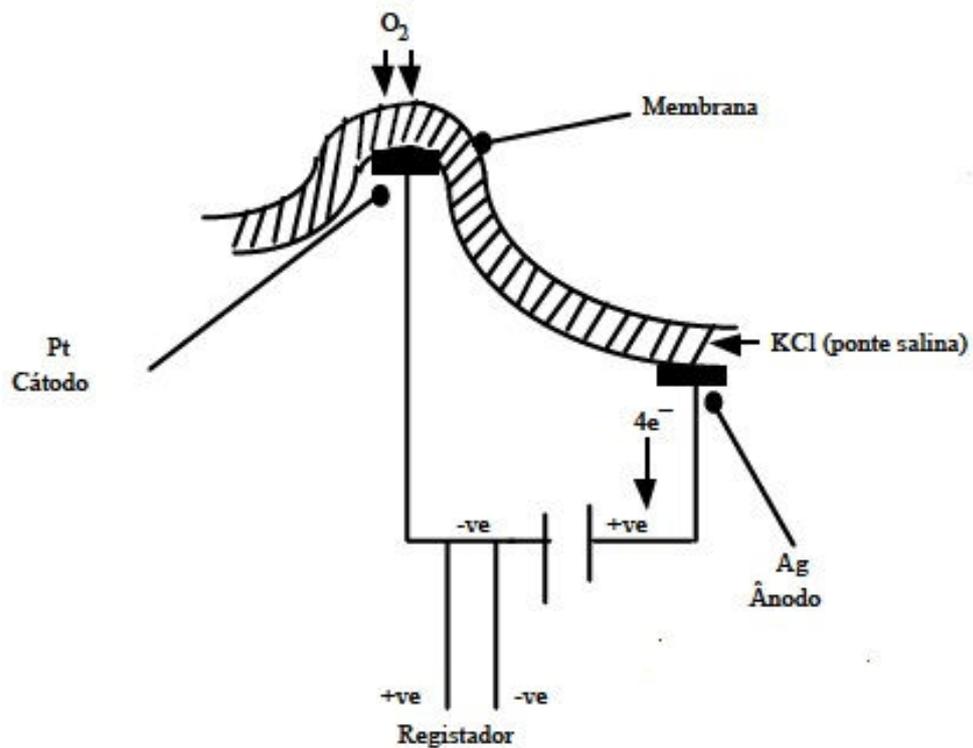
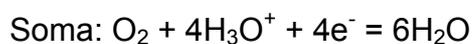
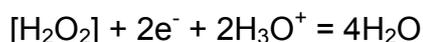
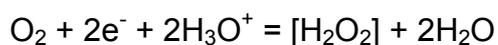


Figura 3. Representação do eletrodo de oxigênio do tipo Clark.

As reações do eletrodo podem ser representadas, conforme segue abaixo:

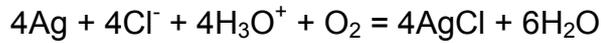
1) No cátodo de platina



2) No ânodo de prata



3) Globalmente



O oxigênio é reduzido pelos elétrons gerados no cátodo (polarizado negativamente). A velocidade de redução de oxigênio (a corrente elétrica gerada) é proporcional à quantidade de oxigênio que difunde através da membrana. Por sua vez, a quantidade de oxigênio que difunde através da membrana depende da concentração de oxigênio dissolvido na solução onde o eletrodo está imerso.

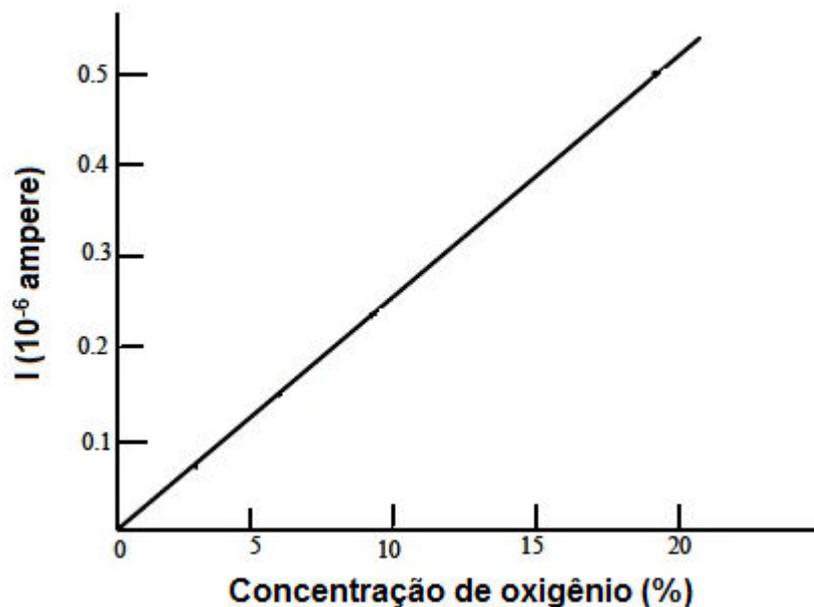


Figura 4. Relação entre a intensidade de corrente e a concentração de O_2 (para uma voltagem na faixa de 0,4 a 0,7 volts) para um eletrodo de Clark imerso em solução aquosa.

As medições utilizando o eletrodo de Clark realizam-se, idealmente, em câmaras de reação. O isolamento do meio de reação impede a difusão de gases para fora ou para dentro do sistema e a agitação constante facilitam o equilíbrio de oxigênio através da membrana. Normalmente o eletrodo de oxigênio é utilizado em associação com um registrador potenciométrico e uma unidade de controle. A unidade de controle é utilizada como fonte de voltagem para polarizar o eletrodo e

como meio auxiliar de calibração. O registrador permite o registro contínuo do consumo (ou liberação) de oxigênio¹³.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Discussão dos Experimentos

A cada um dos experimentos citados na metodologia descrita acima, os autores da patente apresentaram os resultados obtidos, que são discutidos na sequência.

Experimento 1

Os resultados obtidos a partir do primeiro experimento podem ser visualizados abaixo, na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação das quantidades de oxigênio dissolvido nas garrafas contendo ar saturado de água na presença e ausência das lâminas com levedura imobilizada.

Garrafa número	Lâmina presente	Concentração residual de oxigênio após 14 dias
1	Não	7,50 ppm
2	Não	7,40 ppm
3	Não	7,30 ppm
4	Não	7,53 ppm
5	Não	7,13 ppm
6 a 14	Sim	0,00 ppm

Como se pode observar na tabela acima, apenas não se detectou oxigênio dissolvido após 14 dias de incubação nas garrafas que foram vedadas contendo a lâmina de cera com levedura imobilizada, mostrando que a atividade metabólica da levedura não foi prejudicada, uma vez que ocorreu o consumo de oxigênio e a conversão do mesmo em gás carbônico e água.

Experimento 2

O resultado do efeito da viabilidade das células das leveduras na concentração de oxigênio das garrafas contendo cerveja artificial está ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3. Relação da quantidade de oxigênio dissolvido na cerveja artificial, o teor de massa seca de levedura e o seu número de células viáveis.

Espessura da fatia	Teor de matéria seca de levedura (% massa)	Número de células viáveis (unidade arbitrária)	Concentração residual de oxigênio após 7 dias
0 (branco)	-	-	1, 78 ppm
0, 10 mm	92	50	1, 41 ppm
0, 25 mm	92	100	1, 42 ppm
0, 25 mm	96	10. 000	0, 60 ppm

Cabe ressaltar que para um dos quatro experimentos descritos na tabela acima foram realizadas análises em triplicata e o valor de oxigênio medido se manteve constante ao longo das repetições. Em um dos experimentos utilizou-se uma levedura com 96% da matéria seca ao invés de 92% que foi utilizada para misturar com a parafina. A levedura contendo 96% de matéria seca possui menos teor de umidade, a qual é provavelmente a razão pela qual tenha uma melhor capacidade para suportar altas temperaturas. Como pode ser visto nos dados da tabela acima, esta melhora na estabilidade em relação à temperatura não está refletindo apenas no número de células sobreviventes do processo de pasteurização, mas também em uma concentração bem mais baixa de oxigênio residual na garrafa.

Ao contrário do primeiro experimento, onde os teores de oxigênio caíram a zero com a aplicação da lâmina contendo levedura imobilizada, neste caso isto não foi observado, o que já era de se esperar, uma vez que se utilizou cerveja artificial composta por uma série de componentes, os quais, em conjunto, serão responsáveis por elevar a quantidade de oxigênio dissolvido na garrafa, diferentemente do caso onde se utilizou apenas ar saturado de água.

Por outro lado, quando se compara a garrafa que foi utilizada como branco (sem aplicar a lâmina contendo levedura) com as demais, observa-se que

espessuras de lâmina maiores garantem a sobrevivência de mais células viáveis, uma vez que quanto maior for esta espessura, mais as leveduras estarão protegidas durante a pasteurização. Outra observação que deve ser destacada é que quando se utiliza lâminas contendo leveduras com o mesmo teor de matéria seca, mas diferentes espessuras das fatias, pouca diferença é encontrada em relação aos níveis de oxigênio residual, o que mostra novamente que a melhor maneira de reduzir substancialmente esta quantidade de oxigênio dissolvido seria o emprego de leveduras com menos teor de umidade.

Experimento 3

Na Tabela 4 apresentam-se os dados obtidos a partir do experimento 3. Nela pode-se observar que foram estudadas garrafas vedadas por rolha tipo coroa sem nenhuma cobertura (branco), outras contendo apenas a cera e, por fim, as que continham 40 ou 80 mg de cobertura cera-levedura.

Tabela 4. Resultados do oxigênio residual presente em garrafas com cerveja artificial, utilizando-se diferentes coberturas à rolha metálica.

Aplicação na rolha tipo coroa	Residual de oxigênio (ppm) após	
	2 dias	21 dias
Nenhuma	1, 8	2, 3
Apenas 60 mg de cera	-	2, 0
40 mg de cera-levedura	-	1, 2
80 mg de cera-levedura	-	0,58

Para as garrafas que continham algum tipo de cobertura na rolha as medições da quantidade de oxigênio foram realizadas após 21 dias do enchimento. Para o caso das rolhas contendo apenas a cera, não se observou significativa diferença na quantidade de oxigênio dissolvido quando comparadas às rolhas que não possuem esta característica. Nas rolhas que foram fixadas maior quantidade da mistura cera-

levedura, observa-se um decréscimo substancial na quantidade de oxigênio residual. Isto já foi evidenciado no experimento 2, pois uma vez que se adiciona quantidade maior da mistura a espessura da camada irá aumentar permitindo que a levedura imobilizada fique mais protegida e mais células continuem viáveis para realizar sua atividade metabólica.

7.2 Análise crítica dos revestimentos protetores

Recipientes contendo revestimento protetor são preferencialmente armazenados de tal forma que o líquido não entre em contato com a levedura imobilizada, por exemplo, são mantidos em posição vertical, durante a pasteurização bem como durante a estocagem. Este cuidado deve existir tanto pelo fabricante como também antes de vender para o consumidor, embora o contato acidental com o líquido durante o transporte não é prejudicial.

A levedura imobilizada preferencialmente não deve estar presente na área de vedação, por exemplo, no caso de garrafa com rolha tipo coroa com revestimento de polímero, a levedura não deve se mostrar presente entre o bocal da garrafa e a linha do revestimento da rolha. Durante o enchimento e pasteurização algumas cervejas podem espumar de modo que a camada do material imobilizador contendo levedura torne-se completamente molhada antes de completar a pasteurização. Portanto, o material imobilizador deve ser resistente a um curto intervalo de contato direto com o líquido de modo que a levedura imobilizada permaneça bem protegida durante o subsequente tratamento térmico.

Embora algumas destas leveduras possam ser extintas durante a pasteurização, os autores da patente verificaram que isto afeta apenas as camadas exteriores do revestimento. A fim de minimizar o número de células de leveduras mortas, a camada de levedura e do material imobilizador, preferencialmente deve apresentar uma espessura entre 0,1-50 micrometros. Quando usado como uma camada protetora, os requisitos do material imobilizador devem ser diferentes como, por exemplo, resistência à umidade, onde a penetração pode ser diminuída.

Normalmente, no tempo entre a pasteurização e consumo do líquido, a levedura pode vir a remover todo o oxigênio do recipiente. Mesmo quando o recipiente está gelado, por exemplo, para o consumo, a levedura ainda pode estar suficientemente ativa para prevenir o acréscimo do nível de oxigênio.

7.3 Discussão das reações de oxidação envolvidas na deterioração da cerveja: a formação do trans-2-nonenal

Os mecanismos responsáveis pelo aparecimento e/ou desaparecimento de aldeídos na cerveja não são inequivocamente conhecidos. Estudos sobre a origem destes compostos e sobre a sua evolução ao longo do armazenamento da cerveja têm o maior interesse para a indústria cervejeira, a fim de criar estratégias, a nível industrial, que possam minimizar os fatores responsáveis pelo seu aparecimento⁴.

Existem várias vias potenciais para a formação destes aldeídos, mas o presente trabalho possui como objetivo estudar os compostos indesejáveis que se formam pelas reações de oxidação e, entre eles, temos o trans-2-nonenal, devido à sua reconhecida influência sobre as características organolépticas da cerveja. Este aldeído tem sido correlacionado com o aroma/sabor a papel/cartão que pode ser perceptível logo a partir do primeiro mês de envelhecimento da cerveja⁴.

Este aroma/sabor foi referenciado originalmente por Burger et al. durante a década de 50 em cervejas do tipo *lager*. Em 1974, Wang e Siebert demonstraram que não é necessária a participação sinérgica de outros compostos para, juntamente com o aldeído trans-2-nonenal, se sentir o aroma/sabor de papel/cartão. Segundo estes mesmos autores, uma concentração deste aldeído compreendida entre 0,05 ppb e 0,1 ppb é suficiente para fazer sobressair este aroma/gosto característico. O aldeído trans-2-nonenal é, pelas razões apontadas, um composto determinante na qualidade organoléptica de uma cerveja⁴.

A quantidade de trans-2-nonenal presente numa cerveja fresca tende a aumentar ao longo do seu tempo de vida; no entanto, alguns autores verificaram experimentalmente que o nível de trans-2-nonenal pode diminuir numa fase avançada do envelhecimento. Os motivos para o aumento do teor de trans-2-nonenal durante o envelhecimento da cerveja não são consensuais⁴.

Nos próximos parágrafos, descrevem-se três principais vias e equilíbrios em que o trans-2-nonenal participa e que poderão aumentar a concentração deste aldeído na cerveja, são elas: a) oxidação de ácidos graxos, b) auto-oxidação de ácidos graxos, c) foto-oxidação de ácidos graxos, bem como a interação deste aldeído com o antioxidante tipo sulfito (d).

a) *Oxidação de ácidos graxos*

Uma hipótese de mecanismo responsável pelo aumento do teor de trans-2-nonenal em cerveja, envolve a degradação de ácidos graxos¹⁴. Os ácidos graxos, em particular os insaturados, tais como o ácido oleico, linoleico ou linolénico, são introduzidos no processo de fabrico da cerveja pelo malte sob a forma de lípidos e libertados durante produção do mosto pela ação de enzimas⁴.

A oxidação de ácidos graxos varia de acordo com as condições de meio ou das espécies presentes. Condições de temperatura elevada, pH baixo, ou ainda, a presença de cátions metálicos ou espécies oxidantes aceleram a auto-oxidação de ácidos graxos. Pelo contrário, condições de temperatura baixa, ausência de cátions metálicos e de espécies oxidantes, e a presença de aditivos antioxidantes retardam a degradação de ácidos graxos¹⁵.

A figura seguinte (Figura 5) esquematiza dois perfis de absorção de oxigênio que podem ser correlacionados com a velocidade de degradação oxidativa de ácidos graxos e que podem ser verificados em alimentos em função das condições de meio. O perfil (1) traduz o que habitualmente se verifica nos gêneros alimentícios: existe uma primeira fase em que a absorção de oxigênio para o alimento é mínima, e uma fase posterior, em que, ocorre um consumo rápido de oxigênio normalmente responsável pela degradação do alimento. Este perfil é justificado com base no desenvolvimento de reações radicalares. Na primeira fase, não é possível a propagação destas reações, normalmente devido à presença de conservantes e estabilizantes que bloqueiam os radicais; contudo, quando o nível dos conservantes ou estabilizantes diminui, ou deixa de estar disponível, observa-se o desenvolvimento de reações radicalares no alimento. Este último comportamento corresponde ao perfil (2) quando desde o início não existem conservantes e/ou estabilizantes.

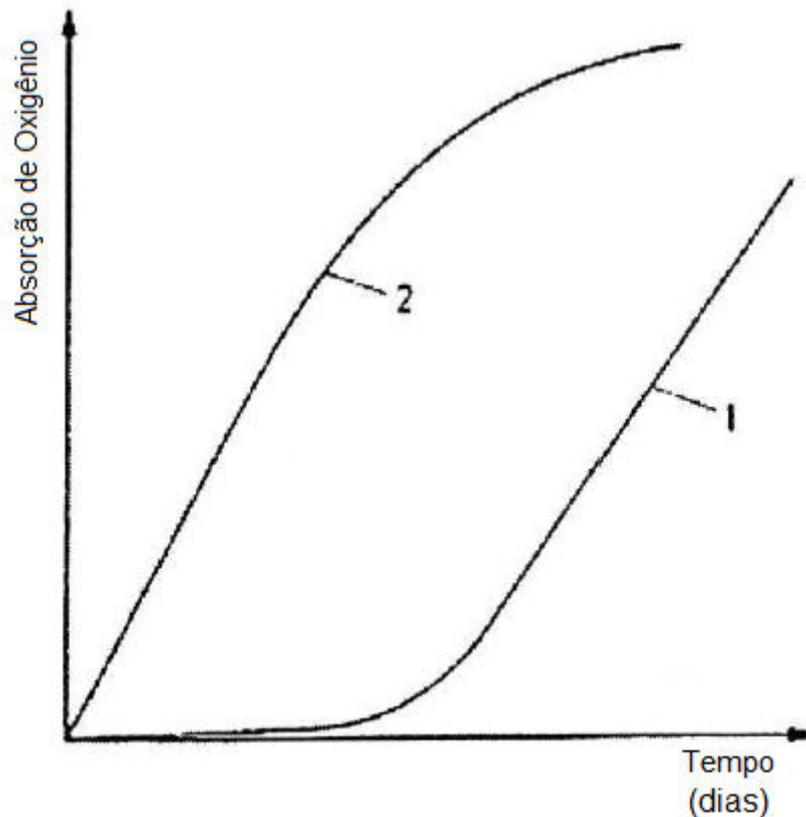


Figura 5. Velocidade de oxidação de ácidos graxos em função das condições de meio; 1 - Concentração de espécies pró-oxidante baixa; 2 - Concentração de espécies pró-oxidante elevada.

De acordo com o descrito na bibliografia, a oxidação dos ácidos graxos pode ocorrer por um mecanismo radicalar, nomeadamente por auto-oxidação e por foto-oxidação, e ainda, por um mecanismo iônico.

b) *Auto-oxidação de ácidos graxos*

O mecanismo de auto-oxidação de ácidos graxos inicia-se pela remoção homolítica de um hidrogênio do ácido graxo por uma espécie radicalar existente na matriz. Esta remoção ocorre com maior probabilidade no carbono alílico do ácido graxo, pois conduz à formação de uma estrutura radicalar estabilizada por ressonância. O mecanismo da auto-oxidação prossegue pela adição de uma molécula de oxigênio ao ácido graxo radical, seguida de uma nova remoção homolítica de um hidrogênio de espécies presentes no meio conduzindo à formação de um hidroperóxido. A reação subsequente envolve a cisão do hidroperóxido com a

formação dos produtos de degradação do ácido graxo. A Figura 6 esquematiza o mecanismo descrito para a formação de trans-2-nonenal a partir da auto-oxidação do ácido linoleico. A formação de trans-2-nonenal resulta da combinação entre o radical hidroxila e o radical 1,3-nonadienilo provenientes da degradação do hidroperóxido.

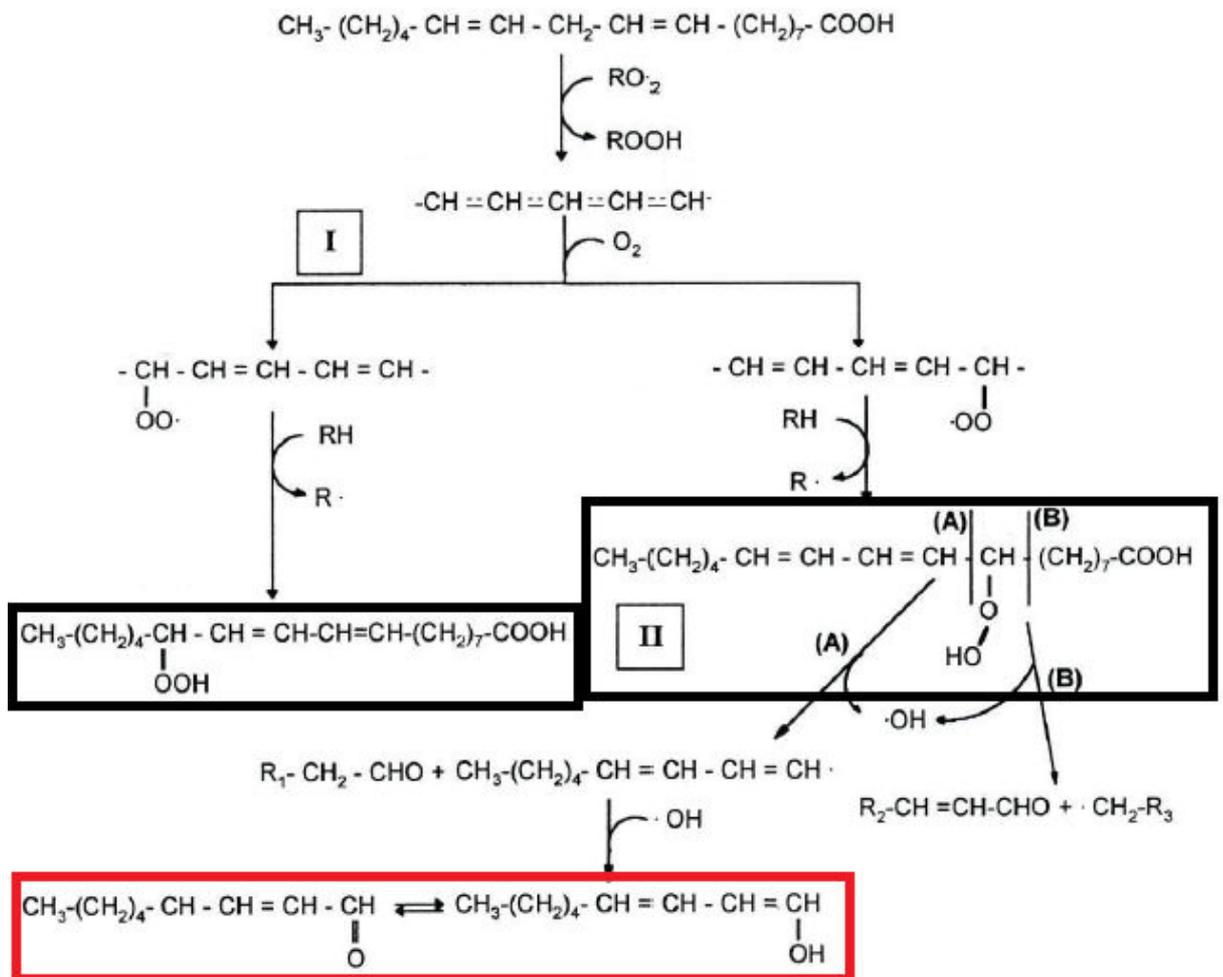


Figura 6. Mecanismo radicalar proposto para a formação do trans-2-nonenal a partir da auto-oxidação do ácido linoleico¹⁵.

Na figura acima, pode-se observar, pelo caminho I, a formação do monohidroperóxido (estrutura contornada pela cor preta) e pelo caminho II, a sua posterior cisão (pela via A), conduzindo à formação do trans-2-nonenal (estrutura contornada pela cor vermelha).

O mecanismo apresentado na figura anterior é apenas uma das muitas vias possíveis para a degradação do ácido linoleico por auto-oxidação. Efetivamente, a

remoção inicial do hidrogênio pode ocorrer no carbono C8 ou no C14, por ambos possuírem hidrogênios alílicos. De igual modo, a adição do oxigênio ao ácido graxo radical também pode ocorrer no carbono C11. Estes mecanismos alternativos justificam a formação de diversos aldeídos saturados e insaturados, que podem igualmente afetar a estabilidade organoléptica da cerveja.

c) *Foto-oxidação de ácidos graxos*

A degradação de ácidos graxos por foto-oxidação ocorre mais rapidamente do que o modo anteriormente descrito. Este mecanismo pressupõe a formação prévia de moléculas de O_2 no estado excitado singlete (a formação de oxigênio no estado excitado singlete resulta da interação entre espécies excitadas pela ação da luz e o oxigênio no estado fundamental) que, ao contrário das moléculas de O_2 no estado fundamental, reage diretamente com os ácidos graxos originando os hidroperóxidos correspondentes.

A interação do O_2 no estado excitado singlete com os ácidos graxos conduz à formação dos hidroperóxidos através de um mecanismo de ciclo-adição conforme se ilustra na Figura 7. No caso concreto do ácido linoleico, está referenciada a formação de quatro moléculas de hidroperóxido por foto-oxidação. Estes hidroperóxidos reagem, posteriormente, de forma análoga à já descrita no item b.

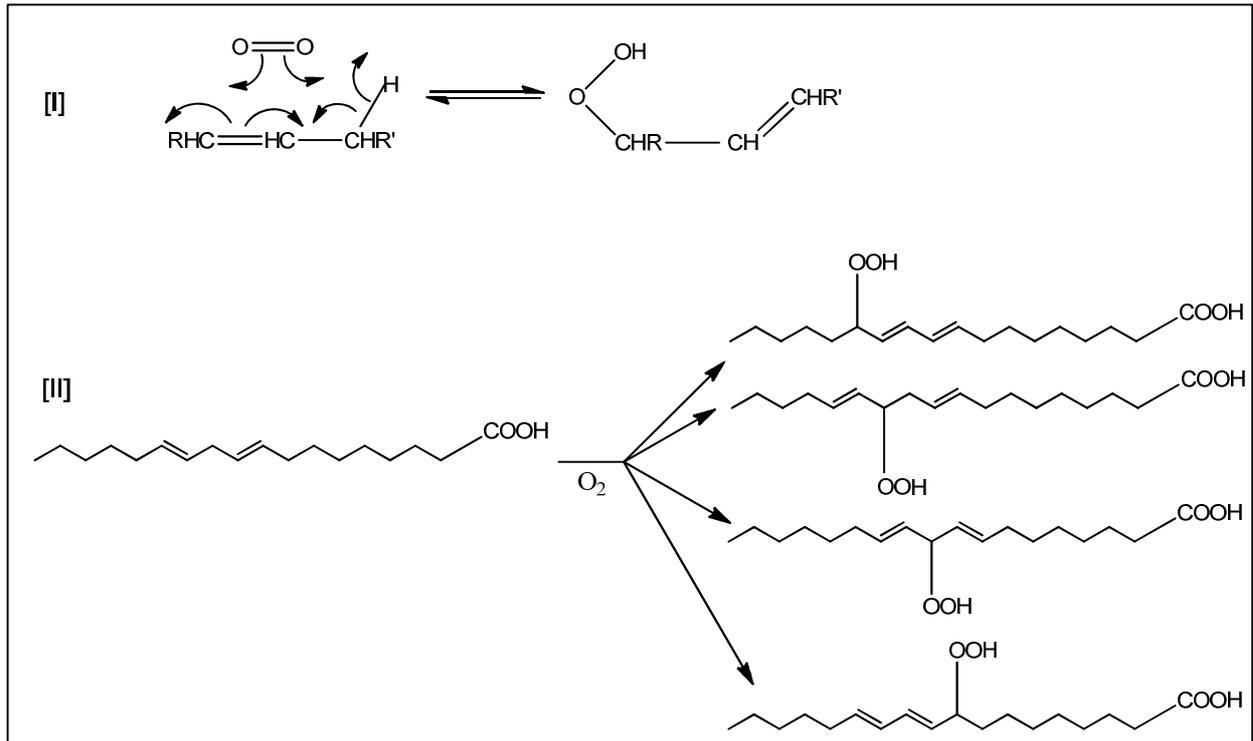


Figura 7. Caminho (I) - Mecanismo proposto de adição de O_2 no estado excitado singlete à ligação dupla do ácido linoleico com formação de um monohidroperóxido; Caminho (II) - Monohidroperóxidos formados por foto-oxidação a partir do ácido linoléico.

d) Estabilidade da cerveja: interação do trans-2-nonenal com o sulfito

A presença de antioxidantes em pequenas quantidades nos alimentos tem a função de prolongar o tempo de estabilidade do produto. Estes aditivos inibem os efeitos negativos de compostos oxidantes, em particular do oxigênio, evitando o desenvolvimento de reações responsáveis pela alteração das características organolépticas desses alimentos. Vários antioxidantes têm sido utilizados pela indústria cervejeira, não sendo por vezes claro o modo de atuação desses compostos. Os antioxidantes mais conhecidos podem distribuir-se nos seguintes grupos¹⁶: ascorbatos (como ácido ascórbico, ascorbato de sódio); sulfitos (como metabissulfito de potássio, sulfito de sódio, hidrogenossulfito de sódio); enzimas (como tirosinase, glucose-oxidase, polifenol-oxidase); fenóis e polifenóis (como ácido maleico, catequina, hidroquinona).

Um dos antioxidantes mais utilizados na indústria cervejeira é o sulfito. Suas principais funções são a atividade antioxidante e a capacidade de formação de

adutos. Esta última propriedade, por sua vez, é de extrema importância, já que certos aldeídos com baixo limiar de percepção e que são continuamente produzidos pela matriz formam, na presença de sulfito, compostos não voláteis muito estáveis, o que eleva o limite de percepção desses aldeídos. Certos investigadores referem que a presença do sulfito poderá ainda evitar/retardar o aumento da concentração de compostos carbonílicos com o tempo, apresentando por isso um papel crucial na proteção ao envelhecimento da cerveja¹⁷.

Em cervejas frescas, altura em que o teor de sulfito é máximo, a maior parte dos aldeídos (em especial os de cadeia curta), encontra-se ligados ao sulfito, igualmente, sob a forma de adutos. À medida que a cerveja envelhece, o nível de sulfito baixa, e como consequência, o nível dos aldeídos sob a forma livre aumenta. Nestas condições, estes aldeídos poderão tomar a posição do *trans*-2-nonenal nos equilíbrios em que este participa, fazendo com que a sua concentração sob a forma livre aumente⁴. A Figura 8 mostra o resultado das ligações entre o *trans*-2-nonenal e o sulfito.

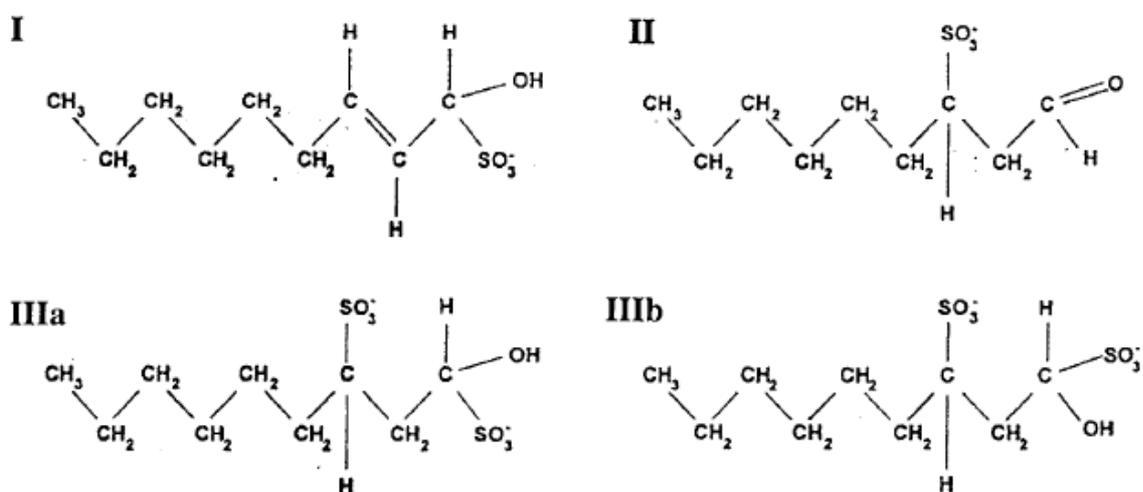


Figura 8. Estruturas resultantes das ligações entre o sulfito e o *trans*-2-nonenal.

7.4 A viabilidade econômica da utilização de filmes poliméricos com leveduras imobilizadas

Para ter-se uma idéia da viabilidade econômica da inovação defendida pela patente e apresentada neste projeto tecnológico, fez-se um estudo do impacto

causado no custo final das rolhas metálicas caso as mesmas contivessem leveduras imobilizadas no interior de seus filmes poliméricos. Para isso, utilizou-se dados de quantidades de levedura e das razões levedura/polímero do Experimento 3, por ser o que mais se aproxima da realidade industrial, uma vez que todos os experimentos foram apenas testados a nível de escala de laboratório.

No Experimento 3 a mistura de cera fundida com levedura foi numa razão de 20/3 gramas, sendo que desta foram aplicadas quantidades de 40 e 80 miligramas no interior das rolhas metálicas. O preço da levedura seca foi pesquisado em alguns locais de venda de produtos para cervejarias artesanais, encontrando-se o valor médio de R\$ 15,00 para uma embalagem contendo 11,5 gramas da levedura *Saccharomyces Cerevisae* (com especificação do percentual de matéria seca entre 94 e 96,5%). Pode-se visualizar na Tabela 5 o custo total que seria investido na aplicação dos filmes.

Tabela 5. Relação da quantidade de levedura empregada nos filmes poliméricos e o custo final dos mesmos.

Massa da mistura filme + levedura (mg)	Quantidade de levedura na mistura (mg)	Valor Total
40	5,22	R\$ 0,007
80	10,44	R\$ 0,014

É importante destacar que estes valores são para embalagens com pequena quantidade de levedura, no entanto, uma vez que aplicado industrialmente, se trabalha com maiores quantidades, tendo-se acesso a embalagens de maiores quantidades e preços mais acessíveis. Para ser possível visualizar o preço final das rolhas, utilizou-se o valor pago pela Companhia de Bebidas das Américas (ambev) por este material, sendo que a unidade de medida é sempre em milhares (mil rolhas). Para um milheiro de rolhas é pago o valor de R\$ 1,83, ou seja, cada rolha custa R\$ 0,0018. Abaixo, na Tabela 6, é possível visualizar, para cada rolha metálica, o impacto causado no custo quando do emprego das leveduras.

Tabela 6. Custo final da utilização de leveduras nas rolhas metálicas.

Quantidade de levedura na rolha (mg)	Valor Total (R\$)
0, 00	0, 0018
5, 22	0,0086
10, 44	0, 015

A utilização de leveduras imobilizadas na rolha metálica aumenta consideravelmente o valor final desta, mas o benefício da sua utilização em relação à qualidade organoléptica da cerveja é imensurável. No caso da utilização destas rolhas, fortes campanhas de marketing são necessárias, a fim de reforçar ao público alvo o diferencial do produto. Uma sugestão seria utilizar este tipo de rolha inicialmente em cervejas mais requintadas, aquelas que o consumidor já está acostumado a pagar mais devido à sua qualidade superior.

7.5 O mercado da cerveja

Uma vez que o presente projeto tecnológico baseia-se no estudo de alternativas para melhorar a qualidade sensorial e as características organolépticas da cerveja, torna-se indispensável discutir o mercado econômico onde este bem de consumo está inserido, com o objetivo de comprovar a gama de oportunidades neste setor e defender a importância e necessidade das inovações.

Em 2006, o Brasil ocupava a quinta posição no ranking dos maiores produtores mundiais de cerveja, sendo superado apenas pela China, Estados Unidos, Alemanha e Rússia. Entretanto, após anos de estagnação, o setor cervejeiro brasileiro apresentou, em 2010, o melhor resultado da última década, com um crescimento de 10% no faturamento e 7,5% no consumo (chegando a 9,7 bilhões de litros), em comparação com o ano de 2005 (Tabela 7). Esses bons resultados foram influenciados diretamente pela estabilidade econômica vivida pelo país, que segundo analistas desse mercado é a principal causa do aumento ou diminuição do consumo da cerveja no Brasil. Para esses especialistas, o aumento da renda está diretamente relacionado com o aumento do consumo de cerveja.

Tabela 7. Consumo de cerveja no Brasil na última década.

Ano	Consumo (10 ⁹ L)	Variação (%)	Consumo <i>per capita</i> (L/ano)	Variação (%)	População (x10 ⁸)
1997	8170	2,1	51,2	1,10	1,596
1998	8160	-0,1	50,4	-1,50	1,618
1999	7880	-3,5	48,1	-4,70	1,639
2000	8230	4,8	49,5	3,10	1,661
2001	8450	2,5	49	-1,10	1,724
2002	8410	-0,5	48,2	-1,80	1,746
2003	8220	-2,3	46,5	-3,50	1,769
2004	8470	3,1	46,6	0,40	1,816
2005	9020	6,5	49	5,00	1,842
2006	9700	7,5	51,9	6,00	1,868

Em 2007, a produção de cerveja no país teria ultrapassado os 10 bilhões de litros, com um faturamento de aproximadamente R\$ 21 bilhões. Porém, o Brasil deve continuar como quinto maior produtor mundial de cerveja, já que nesse mesmo ano, a Rússia teria produzido cerca de 12 bilhões de litros de cerveja. O consumo anual *per capita* também aumentou nestes últimos anos no país, passando de 49 litros em 2005 para quase 52 litros em 2006, e apresenta ainda um grande potencial de crescimento. Basta olhar para países vizinhos como Venezuela, onde são consumidos em média 90 litros por habitante por ano. Entretanto, o consumo *per capita* de cerveja no Brasil continua longe dos países com maior consumo no mundo, tais como a República Tcheca (160 litros), Alemanha (116 litros) e Irlanda (108 litros)⁶.

Um dos principais acontecimentos no mercado brasileiro de cerveja nos últimos anos foi a fusão entre a Antarctica e a Brahma, resultando na multinacional AmBev, em 2000. Em 2004, a AmBev e o grupo belga Interbrew anunciaram uma aliança estratégica, constituindo a maior cervejaria do mundo (InBev), tornando-se a líder mundial do setor com uma participação de aproximadamente 13% do mercado e faturamento anual em 2006 de U\$S 16,7 bilhões. Em 2008, a InBev comprou a cervejaria norte-americana Anheuser-Busch por U\$S 52 bilhões. Com o negócio, a empresa – cujo novo nome será Anheuser-Busch InBev – consolida-se como a maior produtora mundial de cerveja, produzindo 460 milhões de hectolitros de cerveja que corresponde a 25% do volume produzido no mundo.

No Brasil, a AmBev continua sendo a líder absoluta do setor com uma participação de 67,2% (Figura 9). Além das 30 unidades em operação no país, em 2010 foram adquiridas mais duas fábricas pertencentes à cervejaria Cintra e está prevista a construção de uma nova fábrica na região norte do Brasil. Na segunda posição do ranking nacional de cervejarias encontra-se a Schincariol (12,3% de participação no mercado) com dez plantas industriais e mais uma em construção.

Entre os investimentos realizados recentemente pela Schincariol destaca-se a compra das microcervejarias Baden Baden (São Paulo), Eisenbahn (Santa Catarina) e Devassa (Rio de Janeiro) como estratégia para entrar no mercado promissor de cervejas premium. O terceiro lugar no mercado nacional de cervejas pertence à Petrópolis, que possui duas plantas industriais e mais uma em construção. A Petrópolis detém 8,1% de participação no mercado contra 8% da Kaiser, que durante a última década foi vendida para Molson Coors, e em 2006 foi adquirida pela mexicana Femsa. As quatro empresas juntas representam mais de 95% das vendas de cervejas no Brasil e, portanto, as principais estratégias e alterações no mercado passam necessariamente por essas cervejarias.

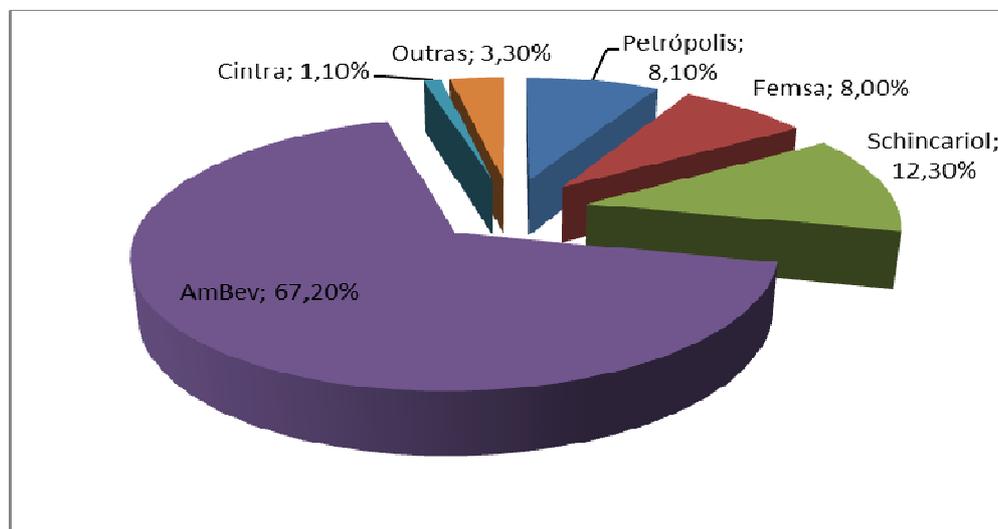


Figura 8. Segmentação do mercado cervejeiro por empresas (abril de 2007).

8. CONCLUSÃO CRÍTICA

A partir do presente projeto tecnológico pode-se evidenciar que a presença de oxigênio em cervejas tipo Pilsen é extremamente prejudicial à qualidade sensorial e características organolépticas deste produto. As reações indesejáveis que prejudicam o *flavour* da cerveja estão atreladas com a presença do oxigênio, pois as principais transformações envolvidas na sua deterioração são de caráter oxidativo, como a formação do trans-2-nonenal, aldeído potencialmente responsável pelo *off-flavor* de papelão.

Para garantir a produção de cervejas com baixos teores de oxigênio dissolvido no produto final, é fundamental que se tenha um rígido controle sobre todos os processos envolvidos, iniciando pela escolha da matéria-prima, que deve ser de indiscutível qualidade. Por outro lado, mesmo se atentando para os detalhes da elaboração da cerveja, é sabido que a mesma ainda sofre incorporação do oxigênio contido no *head space* e este permite que as indesejáveis reações de oxidação continuem ocorrendo durante o armazenamento.

A utilização de vedantes contendo levedura imobilizada é uma alternativa elegante para minimizar as reações de oxidação que ocorrem durante a estocagem da cerveja, aumentando assim a sua vida de prateleira. Esta alternativa pode não parecer viável economicamente, no entanto, conforme relatado, o mercado cervejeiro encontra-se cada vez mais aquecido e isto faz com que se tenha uma grande diversidade de consumidores e oportunidades para lançamentos e inovações.

9. BIBLIOGRAFIA

-
- 1 VANDEDERHAEGE N, P. et al. *Food Chemistry* **2006**, *95*, 357-381.
 - 2 VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Cerveja. In: Almeida Lima, U. Aquarone, E., Borzani, W., Schmidell, W. *Biotecnologia Industrial (Biotecnologia na produção de alimentos)* **2001**, *4*, 91-144.
 - 3 OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Barueri – São Paulo: Manole, **2006**, 1-48.
 - 4 SANTOS, João Rodrigo da Silva. *Dissertação para Mestrado em Química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto*. Porto, **2002**. Portugal.

-
- 5 Edens, L.; Farrok, F.; Frantsiskus, L.A.; Bertus, V. der P.J. Patente EP0305005, publicada em 30/09/1994. Também publicada com as numerações: US5106633 e PT88327.
- 6 VENTURINI FILHO, Waldemar Gastoni. *Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia* – São Paulo: Blucher, **2010**, 1.
- 7 TSCHOPE, E.C. *Microcervejarias e Cervejarias: A História, a Arte e a Tecnologia* - São Paulo: Aden, Brasil, **2001**.
- 8 DE CARVALHO, G.B.M., et al. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 3º parte – A maturação.
- 9 TORTORA, G. J., *et al.* *Microbiologia*. 6ª ed. - Porto Alegre: Artemed, **2000**.
- 10 VARNAM, A.H.; SUTHERLAND, J. P. *Bebidas: tecnología, química y microbiología* - Zaragoza: Acribia, S.A, **1997**, 2 , 289-294.
- 11 GALES, P. W. *Brewing Chemistry and Technology in the America* **2007**.
- 12 BAMFORTH, C. *Sourcing the Soul of Beer, Food Science and Technology* Department University of California - *Brewers Guardian*, **2003**, 132 (9), 22-25.
- 13 BOND, A. M. *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry* - New York: M. Dekker, **1980**.
- 14 DROST, B. W., van der Berg, R., Freijee, F. J. M., van der Velde, E. G., Hollemans, M. *Flavor stability. J. Am. Soc. Brew. Chem*, **1990**, 48, 124-130.
- 15 BELITZ, H.-D., Groseh, W. *Food Chemistry* – London: Springer Verlag, **1987**, 644-654.
- 16 WALTERS, M. T., *Natural Antioxidants and Flavour Stability, J. Inst. Brew.*, **1997**, 10, 111-119.
- 17 BARKER, R. L., Gracey, D. E. F., et al. *Liberation of staling aldehydes during storage of beer, J. Inst. Brew.*, **1983**, 89, 411-415.