



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

PEDRO AUGUSTO SOUTO OUREM COSTA

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA
DE TRIGO**

Recife

2021

PEDRO AUGUSTO SOUTO OUREM COSTA

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA
DE TRIGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Vinhas.

Coorientadora: Profa. Dra. Andreлина Maria Pinheiro Santos.

Recife

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecária Margareth Malta, CRB-4 / 1198

C837i Costa, Pedro Augusto Souto Ourem.
Influência de parâmetros de processo na produção de cerveja de trigo / Pedro Augusto Souto Ourem Costa - 2018.
74 folhas, il., gráfs., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Glória Maria Vinhas.
Coorientadora: Profa. Dra. Andrelina Maria Pinheiro Santos.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2021.
Inclui Referências e Apêndices.

1. Engenharia Química. 2. Cervejas artesanais. 3. Eficiência de processo. 4. Indicativo da presença de ácidos fenólicos. I. Vinhas, Glória Maria (Orientadora). II. Santos, Andrelina Maria Pinheiro (Coorientadora). III. Título.

UFPE

660.2 CDD (22. ed.)

BCTG/2021-125

PEDRO AUGUSTO SOUTO OUREM COSTA

**INFLUÊNCIA DE PARÂMETROS DE PROCESSO NA PRODUÇÃO DE CERVEJA
DE TRIGO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 26 / 02 / 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Glória Maria Vinhas (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Andrelina Maria Pinheiro Santos (Coorientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Eliana Setsuko Kamimura (Examinadora Externa)
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Marcos Francisco Silva (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Luciana Leite de Andrade Lima Arruda (Examinadora Externa)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar esta Dissertação de Mestrado:

À minha família, à minha mãe, Jane, a meu pai, Antônio Maria, a meus irmãos, Antônio Augusto e Maíra, e à minha noiva, Savannah Panton.

A todos os meus colegas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química, à minha Orientadora, Glória Maria Vinhas, e à minha Coorientadora, Andreina Maria Pinheiro Santos, que me auxiliaram e deram suporte durante todas as etapas de realização da pesquisa.

À Cervejaria HIER, localizada em Recife/PE, que disponibilizou seu laboratório para que eu pudesse realizar parte da pesquisa durante o período da pandemia, já que a UFPE estava fechada.

RESUMO

Tradicional da Alemanha, Cerveja de Trigo é um tipo de cerveja conhecido por sua elevada carbonatação, espuma densa e persistente, turbidez e por características sensoriais únicas de cravo. Para otimizar essas características é fundamental entender sobre todas as etapas do processo produtivo e os parâmetros gerais de controle de qualidade, como a concentração de extrato de sólidos dissolvidos (ESD), o teor alcoólico, a temperatura e o pH. A substância responsável pela sensação desejável de cravo é o 4-viniguaiacol (4VG), um composto fenólico do grupo dos compostos vinílicos aromáticos (CVAs), que é produzido pela reação de descarboxilação do ácido ferúlico (AFC), um tipo de ácido fenólico (AF) presente nos diversos maltes usados para produção de cerveja. Porém, similarmente, o estireno, composto indesejável e dito como possível carcinogênico pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), é gerado pela descarboxilação do ácido cinâmico (ACC), outro AF presente nos maltes. Portanto, com base em informações escassas obtidas em estudos da literatura, este estudo escolheu e avaliou quatro parâmetros específicos de produção: a proporção de maltes usados, malte de trigo (MT) e malte de cevada (MC), a temperatura de mostura para extração de AFs, a concentração inicial de levedura e a temperatura inicial de fermentação, em relação à eficiência do processo (baseada nos parâmetros gerais de controle) e à formação do 4VG e do estireno. A metodologia experimental foi dividida em três etapas. Na Etapa 01, os parâmetros de brassagem, proporção dos maltes (50/50, 60/40 e 70/30% MT/MC) e temperatura de mostura (40/45/50 °C) foram analisados com o uso de um equipamento de bancada. Na Etapa 02, repetindo os ensaios da etapa anterior, utilizou-se um equipamento de brassagem de maior escala, automatizado e com melhor controle, com a intenção de obter dados mais confiáveis. As análises estatísticas dos dados obtidos tiveram melhores ajustes ($R^2 > 89\%$) e modelos lineares de primeira ordem preditivos. Gráfica e estatisticamente, em relação ao ESD, os dois parâmetros de brassagem foram significativos, sendo a proporção de MT/MC o mais relevante, com 95% de nível de significância. Os ensaios com menores níveis de proporção de MT, geraram mostos com maiores valores de ESD ($10,58 \pm 0,06$ °brix), ou seja, maior eficiência de brassagem. Na Etapa 03, foi avaliada a fermentação com a variação dos parâmetros de concentração inicial de células de levedura (0,5 e 1,0 bilhão de células.brix-1.L-1) e de temperatura inicial de

fermentação (18 e 24 °C), cujos resultados foram analisados graficamente em relação ao ESD, ao teor alcoólico e ao pH. Observou-se uma tendência de maior eficiência de fermentação nos níveis superiores (1,0 bilhão de células.brix-1.L-1 e 24 °C). Já, em relação à formação dos CVAs, nas etapas 02 e 03, foi notado um indicativo da presença dos ácidos ferúlico e cinâmico, precursores do 4VG e estireno. Sendo assim, concluiu-se que, na faixa avaliada, a eficiência de mostura aumenta com menores proporções de MT. Em relação a formação dos CVAs (4VG e estireno), este estudo é importante como base científica para futuros projetos acadêmicos sobre Cerveja de Trigo.

Palavras-chave: cervejas artesanais; eficiência de processo; indicativo da presença de ácidos fenólicos.

ABSTRACT

Traditional from Germany, Wheat Beer is a type of beer known for its high carbonation level, dense and persistent foam, turbidity, and unique sensorial clove characteristic. To optimize these characteristics, it is essential to understand every step of the process and the general parameters used for quality control, such as dissolved solids extract (ESD), alcohol content, temperature, and pH. The substance responsible for the desirable clove-like characteristic is 4-vinyguaicol (4VG), a phenolic compound of the group vinyl aromatic compounds (CVAs), produced by the decarboxylation reaction of ferulic acid (AFC), a type of phenolic acid (AF) found in the various types of malts used in beer production. However, similarly, styrene, an undesired compound and described as a possible carcinogen by the International Agency for Research on Cancer (IARC) (2018), is formed by the decarboxylation of cinnamic acid (ACC), obtained from the same malts. Therefore, according with scarce information's from studies on the literature, this project chose and evaluated four specific production parameters: proportion of malts used, barley malt (MC) and wheat malt (MT), mashing temperature for phenolic acids (AFs) extraction, initial yeast concentration and initial fermentation temperature, in relation to the process efficiency (based on the general quality control parameters) and to 4VG and styrene formation. The experimental methodology was divided in three steps. In step 01, the brewing parameters, malt proportion (50/50, 60/40 e 70/30% MT/MC) and mashing temperature (40/45/50 °C) were analyzed using a bench brewing equipment. In step 02, repeating the essays of the last step, it was used an automatized larger-scale brewing equipment with the goal to obtain more reliable results. The statistics analyzes of the data of this step generated better adjustment ($R^2 > 89\%$) and predictive first order linear models. Graphically and statistically, in relation to ESD, both parameters were significant, but the parameter of MT/MC proportion was noted to be more significant, with 95% of confidence level. The assays with less wheat malt proportions had mashes with higher ESD ($10,58 \pm 0,06$ °brix), in other words, with higher brewing efficiency. In step 03, the fermentation was evaluated with the variation of the parameters of initial yeast concentration (0,5 e 1,0 billion cells.brix-1.L-1), and initial fermentation temperature (18 e 24 °C), which were analyzed graphically in relation to ESD, alcohol content, and pH. It was observed a tendency of higher fermentation efficiency in the superior levels of the parameters (1,0 billion

cells.brix-1.L-1 and 24 °C). Thus, in relation to CVAs formation, in steps 01 and 02, it was noted an indicative of the presence of ferulic and cinnamic acids, which are precursors of 4VG and styrene, respectively. Therefore, it was concluded that, in this studied range, the mashing efficiency increases with lower proportion of wheat malt. Regarding to the CVAs formation (4VG and styrene), this study is important as a scientific resource for future Wheat Beer academic projects.

Keywords: craft beers; process efficiency; indicative of phenolic acids presence.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABCs	Ácidos hidroxibenzoicos
ABV	Alcohol by volume
ACC	Ácido cinâmico
AFC	Ácido ferúlico
AFs	Ácidos fenólicos
AHCs	Ácidos hidroxicinâmicos
APC	Ácido p-cumárico
AXs	Arabinoxilanas
CO ₂	Dióxido de carbono
CVAs	Compostos vinílicos aromáticos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESD	Extrato de sólidos dissolvidos
FDC1	Ferulic acid decarboxylase
HPLC	High performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
MC	Malte de cevada
MT	Malte de trigo
PAD1	Phenylacrylic acid decarboxylase
Pof ⁺	Phenolic off-flavor positivo
VMPS	Valores mínimos de percepção sensorial
4VG	4-viniguaiacol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBJETIVO GERAL.....	13
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2	FUNDAMENTAÇÃO	15
2.1	MERCADO DE CERVEJA ARTESANAL NO BRASIL.....	15
2.2	CARACTERÍSTICAS DA CERVEJA DE TRIGO	16
2.3	PROCESSO DE PRODUÇÃO.....	16
2.3.1	Brassagem	17
2.3.1.1	Moagem.....	17
2.3.1.2	Mostura.....	17
2.3.1.3	Clarificação.....	18
2.3.1.4	Fervura	18
2.3.1.5	Resfriamento e oxigenação	19
2.3.2	Fermentação	19
2.3.2.1	Fase de adaptação	19
2.3.2.2	Etapa de crescimento logarítmico ou fermentação primária	20
2.3.2.3	Maturação, carbonatação e envase.....	20
2.4	COMPOSTOS VINÍLICOS AROMÁTICOS.....	21
2.4.1	Origem	21
2.4.2	Percepção sensorial e mecanismo de formação	22
2.4.3	Estireno e toxicologia	23
2.5	PARÂMETROS DO PROCESSO	24
2.5.1	Proporção de maltes	25
2.5.2	Temperatura e pH de mostura	26
2.5.3	Tempo de fervura	28
2.5.4	Tipos e concentração inicial de levedura	28
2.5.5	Temperatura de fermentação	30
3	METODOLOGIA	31
3.1	PRIMEIRA ETAPA.....	31
3.1.1	Brassagem	32
3.1.1.1	Moagem.....	32

3.1.1.2	Mostura.....	33
3.1.1.3	Clarificação.....	34
3.1.1.4	Fervura	34
3.2	SEGUNDA ETAPA	35
3.2.1	Brassagem	35
3.3	TERCEIRA ETAPA.....	36
3.3.1	Fermentação, maturação, carbonatação e envase	36
3.3.2	Controle dos parâmetros de fermentação.....	38
3.3.2.1	Concentração inicial de leveduras	38
3.3.2.2	Temperatura inicial de fermentação	38
3.4	DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	39
3.4.1	Extrato de sólidos dissolvidos e teor alcoólico.....	39
3.4.2	pH.....	41
3.4.3	Viabilidade celular	42
3.4.4	Análise da presença de AFs por cromatografia líquida	43
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
4.1	PRIMEIRA ETAPA.....	45
4.1.1	Extrato de sólidos dissolvidos	45
4.1.2	pH.....	48
4.2	SEGUNDA ETAPA	50
4.2.1	Extrato de sólidos dissolvidos, pH e presença de ácidos fenólicos	50
4.3	TERCEIRA ETAPA.....	55
4.3.1	Concentração e viabilidade celular iniciais.....	55
4.3.2	Extrato de sólidos dissolvidos, teor alcoólico (v/v), pH e presença de AFs.....	56
5	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS	66
	APÊNDICE A - ESQUEMA DO PROCESSO DE BRASSAGEM COMPLETO	70
	APÊNDICE B - VOLUMES MEDIDOS E PADRONIZADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL	71
	APÊNDICE C - VALORES DE PH	74

1 INTRODUÇÃO

Cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil, sendo o terceiro maior consumidor e produtor do mundo (KIRIN HOLDINGS COMPANY, 2020). As cervejas do tipo *Lager*, produzidas pelas grandes cervejarias como Ambev, Heineken e Grupo Petrópolis, representam a maior parcela de consumo no país. O consumo das cervejas artesanais, embora represente uma pequena parcela do consumo nacional, está em tendência de crescimento, como pode ser visto nos últimos anos, pelo aumento de cervejarias registradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pelo controle e fiscalização da produção de bebidas alcoólicas no país (DIAS, FALCONI, 2018). O aumento dessa demanda gera a necessidade de melhoria da qualidade do processo produtivo de cerveja para garantir que os produtos tendam aos padrões de cada estilo de cerveja.

Cerveja de Trigo, um estilo tradicional e originário da Alemanha, é conhecida por sua alta carbonatação, turbidez, espuma densa e persistente, teor alcoólico moderado em torno de 4,5% ABV (*alcohol by volume*), mas principalmente por suas características sensoriais de banana e cravo (STRONG, ENGLAND, 2015; PAPAIZIAN *et al.*, 2017). Para se obter um produto dentro dos padrões recomendados pelo estilo de Cerveja de Trigo, é importante entender sobre todas as etapas do processo e sobre os parâmetros gerais de controle de qualidade, como o extrato de sólidos dissolvidos (ESD), o pH e o teor alcoólico, que são relacionados diretamente com a atividade enzimática e com a eficiência das etapas do processo (KUNZE, 2010).

A produção de Cerveja de Trigo é dividida em duas etapas: brassagem e fermentação. A brassagem consiste na produção do mosto, líquido contendo os compostos extraídos dos maltes, como açúcares fermentescíveis. A fermentação é a etapa na qual a levedura metaboliza esses compostos do mosto em outros diversos compostos, sendo a reação mais importante o consumo dos açúcares para a produção de álcoois e gás carbônico. Adicionalmente, a brassagem possui as subetapas de moagem, mostura, clarificação e fervura; já a fermentação é dividida em fermentação primária, fase de adaptação, maturação, carbonatação e envase (MOSHER, TRANTHAM, 2016; PALMER, 2017).

Um diferencial da Cerveja de Trigo é a característica sensorial de cravo. A molécula química associada a esse aroma é o 4-viniguaicol (4VG), um composto

fenólico obtido quando há a remoção de uma molécula de gás carbônico do ácido ferúlico (AFC), um dos ácidos fenólicos presentes nos diversos tipos de maltes usados na produção de cerveja. Essa reação é conhecida como descarboxilação e pode ocorrer de duas maneiras: termicamente a altas temperaturas, ao longo da mostura e da fervura, e, enzimaticamente, durante a fermentação, quando usadas leveduras *Ale*, *Saccharomyces cerevisiae*, com atividade Pof⁺ (*phenolic off-flavor* positivo) (VANBENEDEN *et al.*, 2007). Porém, outro composto aromático pode ser gerado pelo mesmo mecanismo de descarboxilação do ácido cinâmico (ACC), resultando no estireno. Esse composto, ao contrário do 4VG, é indesejável por sua toxicidade (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), 2018).

Sendo assim, para manter uma alta eficiência de processo, com base nos parâmetros gerais de controle e otimizar a formação do 4VG e do estireno, alguns parâmetros foram avaliados com base em informações obtidas em estudos da literatura. A Cerveja de Trigo é tradicionalmente produzida com uma proporção entre 50 e 70% de malte de trigo (MT), sendo o restante de malte de cevada (MC) (STRONG, ENGLAND, 2015; PAPAIZIAN *et al.*, 2017). A temperatura e o pH de mostura têm influência direta na atividade de todas as enzimas presentes na etapa, inclusive das enzimas responsáveis pela extração dos precursores dos CVAs, que atuam melhor em temperaturas próximas a 45 °C (MCMURROUGH *et al.*, 1996; COGHE *et al.*, 2004) e pH em torno de 5,8 (VANBENEDEN *et al.* 2008b). Já a concentração inicial de levedura e a temperatura de fermentação são diretamente proporcionais à atividade enzimática, acelerando a produção de todos os produtos e subprodutos do metabolismo celular (SCHWARZ, BOITZ, METHNER, 2012; SCHWARZ, STUBNER, METHNER, 2012; GRANVOGL, LANGOS, 2016).

1.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo teve como objetivo avaliar os parâmetros de processo, com a intenção de otimizar o rendimento das etapas de brassagem e fermentação e analisar a presença dos ácidos fenólicos, ferúlico e cinâmico, precursores respectivamente do 4VG, desejável, e estireno, indesejável na Cerveja de Trigo.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definição dos parâmetros de processo das etapas de brassagem e fermentação com base em informações de estudos da literatura.
- Determinação da(s) melhor(es) condição(ões) dos parâmetros de brassagem, pela avaliação da variação da concentração de sólidos dissolvidos, ESD (°brix) e do pH.
- Determinação da(s) melhor(es) condição(ões) dos parâmetros de fermentação, pela avaliação da variação da concentração de sólidos dissolvidos, ESD (°brix), teor alcoólico (v/v) e do pH.
- Análise da variação da presença dos ácidos ferúlico e cinâmico, nas duas etapas do processo, nas condições estudadas.

2 FUNDAMENTAÇÃO

Na produção de Cerveja de Trigo, como em qualquer outro tipo de cerveja, alguns parâmetros analíticos básicos, como a concentração de sólidos dissolvidos, ESD, (°brix), o pH, o teor alcoólico e a viabilidade celular, devem ser medidos para manterem a normalidade do processo e a qualidade do produto. Entretanto, para esse tipo de cerveja, além desses parâmetros gerais de produção, outros também são importantes, como a geração dos CVAs (STRONG, ENGLAND, 2015; PAPAIZIAN *et al.*, 2017). Sendo uns desejáveis, como o 4-viniguaiacol, por gerar características sensoriais adequadas ao estilo, e outros indesejáveis, como o estireno, devido à sua toxicologia (GRANVOGL, LANGOS, 2016).

2.1 MERCADO DE CERVEJA ARTESANAL NO BRASIL

Cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil, sendo o terceiro maior consumidor do mundo, com 12.401.000 quilolitros no ano de 2019, que representa 6,6% do consumo global (KIRIN HOLDINGS COMPANY, 2020). Em termos de produção, o Brasil também está em terceiro no rank mundial, com 14.137.900 quilolitros no ano de 2018, apresentando um crescimento de 36,7% desde 2008 até 2018 (KIRIN HOLDINGS COMPANY, 2019). As cervejas do tipo *Lager*, produzidas pelas grandes cervejarias como Ambev, Heineken e Grupo Petrópolis, representam 98% do consumo no país. Já as cervejas artesanais, embora representem uma pequena parcela do mercado, estão em tendência de crescimento, evidenciado pela quantidade de cervejarias artesanais registradas nos últimos anos pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pelo controle e pela fiscalização da produção de bebidas alcoólicas no país. Em 2008, menos de 100 cervejarias foram registradas; já em 2018, o país possuía 835. (DIAS, FALCONI, 2018). Sendo assim, com o aumento de demanda das cervejas artesanais, a pesquisa científica em relação aos diversos aspectos dessas cervejas é importante para suprir a necessidade de melhoria contínua das características sensoriais únicas de cada estilo de cerveja.

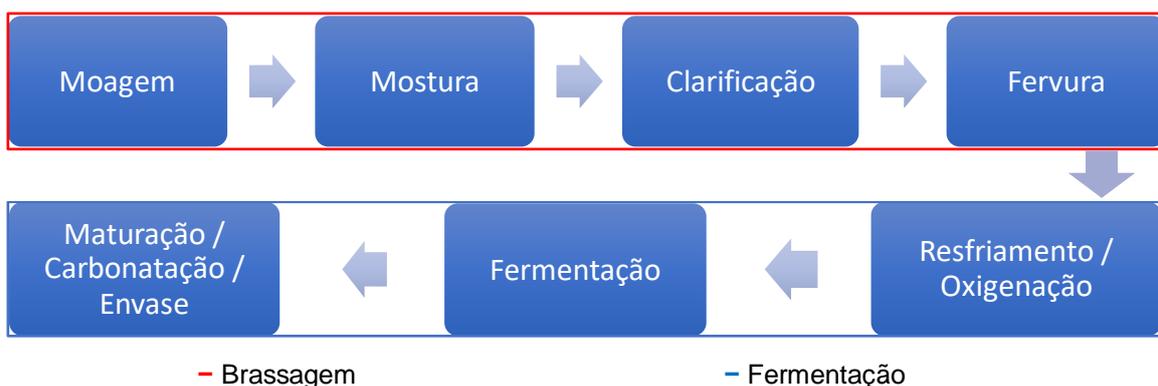
2.2 CARACTERÍSTICAS DA CERVEJA DE TRIGO

A Cerveja de Trigo tem sua história datada há centenas de anos na Bavária, região da Alemanha. A *Weissbier*, como é tradicionalmente conhecida, apresenta uma aparência turva, uma espuma densa e persistente, uma alta carbonatação e notas sensoriais frutadas de banana e cravo, além de uma leve presença de notas sensoriais de pão vindas do malte de trigo, sendo a receita constituída de 50 a 70% de malte de trigo e o restante de malte de cevada. Nesse estilo, o lúpulo está presente em baixa concentração com a finalidade de balancear o dulçor dos maltes. Outras variedades de cerveja de trigo surgiram com o tempo, como a *Dunkle Weissbier*, a *Weizenbock*, a *Berliner Weisse*, a *Witbier* e a Cerveja de Trigo Americana, sendo alteradas algumas características da tradicional cerveja da Bavária, porém sempre mantendo o caráter sensorial fermentativo (STRONG, ENGLAND, 2015; PAPAZIAN *et al.*, 2017).

2.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO

O processo de produção de Cerveja de Trigo pode ser dividido em duas principais etapas: brassagem e fermentação. Em resumo, na primeira etapa, os componentes complexos dos maltes, como o amido, são solubilizados em água e degradados enzimaticamente, resultando em um líquido, chamado de mosto, com componentes mais simples, como açúcares. Na segunda etapa, os componentes simples do mosto são metabolizados pelas leveduras, gerando como principais produtos, o etanol e o gás carbônico, resultando nas cervejas (PALMER, 2017, KUNZE, 2010). Essas etapas possuem subetapas, como mostrado na Figura 1 e como será explicado em seguida.

Figura 1 – Etapas do processo de produção de cerveja



Fonte: O Autor, 2020.

2.3.1 Brassagem

2.3.1.1 Moagem

A primeira etapa do processo é a moagem. Nela, os maltes são moídos para que seus componentes internos possam ser hidrolisados e para que as enzimas do processo atuem mais facilmente. Entretanto, a maneira como é realizada a moagem dos maltes depende do tipo de processo produtivo aplicado. Na maioria das cervejarias atuais, realiza-se a etapa de clarificação, que tem como fundamento o uso das cascas dos maltes como meio filtrante para separar a fase líquida da sólida e para extrair o máximo de açúcar delas, elevando a eficiência do processo. Dessa forma, para conseguir gerar um meio filtrante adequado com o máximo de eficiência de extração de açúcar dois pontos precisam ser avaliados na moagem: a integridade das cascas e a disponibilidade do material interno dos maltes. Em resumo, as cascas precisam estar as mais intactas possíveis, para se ter uma melhor filtração durante a clarificação, ao mesmo passo que o material interno do malte deve estar o mais exposto à água e à atividade enzimática. Sendo assim, para atingir nível de quebra ideal durante a moagem, faz-se necessário o ajuste do espaçamento dos rolos do moinho. De acordo com Kunze (2010), em um moinho de 2 rolos, por exemplo, o espaçamento ideal entre eles está em torno de 0,8 mm.

2.3.1.2 Mostura

Durante a mostura, os maltes moídos são misturados com água e condicionados a faixas de temperatura específicas durante tempos predeterminados, chamadas de rampas de temperatura. Cada rampa de temperatura possui sua função no processo e está ligada à atuação de um grupo de enzima específico. Um dos grupos de enzimas mais importante é o das amilases, sendo as principais a α -amilase e a β -amilase. Elas quebram o amido presente nos maltes, estruturas compostas por várias moléculas de glicose unidas, em açúcares fermentescíveis ou não, em um processo conhecido como sacarificação. Essas enzimas atuam diferentemente na quebra dos amidos. A α -amilase hidrolisa as ligações entre as glicoses produzindo polímeros de glicose de vários tamanhos, como glicose, maltose e maltotriose. Já a β -amilase não tem capacidade de quebrar a estrutura em moléculas únicas de glicose, mas, apenas, no máximo, em maltose (dissacarídeo com duas moléculas de glicose), o que resulta na formação de uma maior

quantidade de açúcares de cadeias mais longas não fermentescíveis. Da mesma forma que a atuação dessas enzimas é diferente, as condições de temperatura e de pH também são. A α -amilase trabalha em uma faixa ótima entre 63 e 70 °C e de pH entre 5,6 e 5,8 e a β -amilase, na faixa de temperatura de 55 e 65 °C e 5,4 e 5,6 de pH (MOSHER, TRANTHAM, 2016).

Após o término das rampas de temperatura enzimáticas e antes da clarificação do mosto, uma outra rampa, chamada de “*mash out*”, é utilizada. Nela, a temperatura do mosto é elevada para em torno de 77 °C, com o intuito de cessar a atividade enzimática e manter o perfil de compostos fermentescíveis, pois as enzimas se desnaturam nessa condição, e de reduzir a viscosidade do mosto, facilitando a etapa seguinte de clarificação (PALMER, 2017).

2.3.1.3 Clarificação

Nessa etapa, o objetivo é a separação das fases sólida e líquida obtidas na mostura. Na indústria, existem várias maneiras de fazer isso, sendo a mais comum, o uso de uma segunda tina, chamada de tina de clarificação. Esse equipamento possui, na sua seção inferior, uma placa com vários buracos, que funciona como uma peneira que retém a fase sólida da líquida. À medida que o líquido é transferido por baixo da tina, os maltes são lavados com água quente para facilitar a filtração e extrair o máximo de açúcar ainda presente neles (MOSHER, TRANTHAM, 2016).

2.3.1.4 Fervura

Nesse momento, vários processos importantes acontecem, como a extração e a transformação das substâncias de amargor e sabor dos lúpulos adicionados, a formação e a precipitação de proteínas, a evaporação da água e consequente volatilização de compostos indesejáveis e a esterilização do mosto. Após o tempo predeterminado de fervura, geralmente entre 60 e 90 minutos, os resíduos sólidos do mosto gerados são separados. O procedimento mais comum é conhecido como “*Whirpool*”, que é um método simples, na qual o mosto é rotacionado dentro da tina, fazendo com que o sedimentado sólido se posicione no centro e, assim, facilite a transferência da fase líquida para a etapa de fermentação (KUNZE, 2010).

2.3.1.5 Resfriamento e oxigenação

Durante a transferência para o fermentador, o mosto é esfriado a temperaturas próximas à temperatura de fermentação das leveduras, que varia de acordo com o tipo. Existem dois tipos principais de leveduras, leveduras do tipo *Lager*, que fermentam em temperaturas baixas, geralmente na faixa de 10 a 13 °C, e leveduras do tipo *Ale*, que fermentam em temperaturas mais elevadas, idealmente na faixa 18 a 21 °C. No caso específico de Cerveja de Trigo, a levedura usada é do tipo *Ale* (WHITE, ZAINASHEFF, 2010). Outro parâmetro de pré-fermentação controlado é o oxigênio dissolvido do mosto. Ele é importante durante a primeira etapa de fermentação, a adaptação celular, fase em que as leveduras sintetizam ácidos graxos insaturados e esteróis, componentes estruturais fundamentais para a boa permeabilidade de suas membranas celulares sendo, assim, importantes para sua reprodução e vitalidade (KUCHARCZYK, TUSZYNSKI, 2017).

2.3.2 Fermentação

O mosto esfriado e oxigenado é então misturado com uma quantidade predeterminada de levedura para iniciar a etapa de fermentação. Nessa etapa, não só ocorre a conversão dos açúcares em etanol e dióxido de carbono mas também a formação de produtos secundários desejáveis ou indesejáveis. A maneira como esses compostos são produzidos depende das condições em que a levedura está adaptada. Por essa razão, é importante entender o metabolismo da levedura e como ele é afetado por certos parâmetros, como a temperatura, o pH, o tempo, a concentração de açúcar e a concentração inicial de levedura (WHITE, ZAINASHEFF, 2010). A fermentação pode ser dividida em três fases: a fase de adaptação, a fase de crescimento logarítmico e a fase de maturação.

2.3.2.1 Fase de adaptação

Durante a fase de adaptação, ocorre o ajuste do metabolismo celular que depende da concentração inicial dos açúcares e dos nutrientes presentes no mosto e das condições de temperatura e pH do meio. Nessa etapa, a levedura utiliza suas reservas de glicogênio e lipídeos, com o oxigênio dissolvido do mosto para sintetizar esteróis e ácidos graxos, compostos importantes na estrutura e na permeabilidade

da membrana celular, ou seja, importante para a reprodução celular. Essa fase dura normalmente entre 12 e 24 horas em fermentação de leveduras do tipo *A/e* (WHITE, ZAINASHEFF, 2010).

2.3.2.2 Etapa de crescimento logarítmico ou fermentação primária

Após a adaptação celular, inicia-se a fermentação primária, fase de reprodução celular, em que há o consumo dos açúcares fermentescíveis e a geração do etanol, do dióxido de carbono e de outros produtos secundários de fermentação, como é caso do 4-vinilguaicol (4VG), composto fenólico desejável mais importante no estilo de Cerveja de Trigo. A duração dessa fase em cervejas do tipo *A/e* é em torno de 3 dias, sendo mais rápida comparada com a do tipo *Lager*, em média de 5 dias. Isso ocorre devido ao uso de uma maior temperatura inicial de fermentação que acelera o metabolismo celular. Dessa forma, a avaliação desse parâmetro é importante para obter uma alta taxa de consumo de açúcar e de produção de álcool, somado à produção do 4VG em nível equilibrado para o estilo. Além da temperatura de fermentação, outros fatores que refletem na atividade celular também são importantes, como a concentração inicial de células e a viabilidade celular (WHITE, ZAINASHEFF, 2010). Nessa etapa também ocorre uma redução substancialmente para valores em torno de 4,3 a 4,6 devido à formação de ácidos orgânicos e às reações metabólicas na qual íons H^+ são liberados (KUNZE, 2010).

2.3.2.3 Maturação, carbonatação e envase

Com a redução da concentração de açúcares do mosto, a atividade celular é diminuída, e o processo entra em outra fase, a maturação. A maturação é dividida em duas etapas: (1) descanso diacetil, na qual a temperatura é elevada em torno de 5 °C com a finalidade de usar o próprio metabolismo celular para consumir compostos indesejáveis, como o diacetil e o acetaldeído (WHITE, ZAINASHEFF, 2010) e (2) maturação, na qual a temperatura é reduzida a valores próximos a 0 °C, com o objetivo de decantar a levedura e outros compostos que provocam turbidez à cerveja e deixá-la pronta para ser carbonatada e envasada (PALMER, 2017).

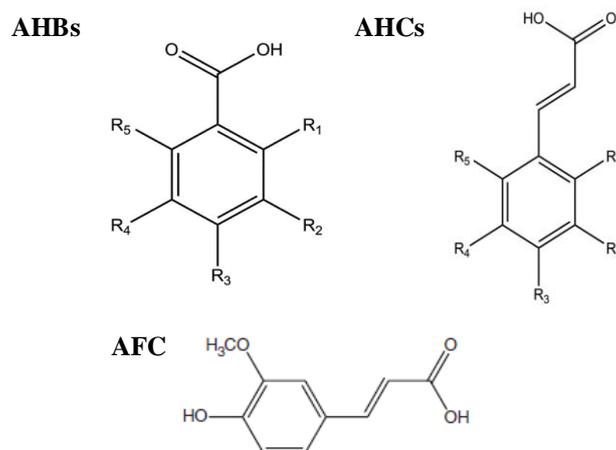
2.4 COMPOSTOS VINÍLICOS AROMÁTICOS

Um dos grupos de moléculas responsável pela característica sensorial da Cerveja de Trigo é o grupo de compostos vinílicos aromáticos (CVAs), sendo a molécula mais importante o 4-vinilguaicol (4VG), que é conhecido pelo caráter de cravo. Esse composto é formado pela reação de descarboxilação de um ácido fenólico (AF), comum nos diversos tipos de maltes usados na produção de cerveja, o ácido ferúlico (AFC) (LENTZ, 2018). Já o estireno, um CVA não desejável na Cerveja de Trigo, também pode ser produzido pela mesma reação (GRANVOGL, LANGOS, 2016; SCHWARZ, BOITZ, METHNER, 2012; SCHWARZ, STUBNER, METHNER, 2012)

2.4.1 Origem

Os ácidos fenólicos são os compostos fenólicos mais abundantes nos maltes utilizados na produção de cerveja. Eles são divididos em dois outros grupos: os derivados do ácido cinâmico (**A**), ou ácidos hidroxicinâmicos (AHCs), e os derivados do ácido benzoico (**B**), ou ácidos hidroxibenzoicos (AHBs). O AFC faz parte do grupo derivado do AHCs, como pode ser visualizado por suas estruturas moleculares (Figura 1). (SANCHEZ-MALDONADO, SCHIEBER, GANZLE, 2011; WANNENMACHER, GASTL, BECKER, 2018).

Figura 2 – Estruturas dos ácidos hidroxibenzoicos (**AHBs**), hidroxicinâmicos (**AHCs**) e ferúlico (**AFC**)



Fonte: Sanchez-Maldonado, Schieber, Ganzle (2011); Wannemacher, Gastl, Becker (2018).

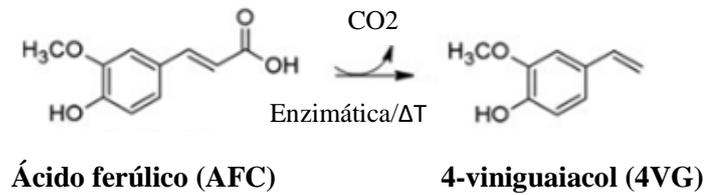
Nos maltes, a maior parte dos AFs estão presentes na forma insolúvel através de ligações ésteres a carboidratos da parede celular e, em uma menor concentração, nas formas solúveis, como ácido livre ou como ácidos conjugados a açúcares (WANNENMACHER, GASTL, BECKER, 2018). Os ácidos derivados dos AHCs, como o AFC, estão presentes, principalmente, por ligações ésteres a arabinoxilanas (AXs) que, segundo Izydorczyk (2019), é o polissacarídeo não celulósico mais abundante na parede celular dos cereais. De acordo com Lentz (2018), mais de 90% desses ácidos presentes nos maltes possuem ligação éster, e a liberação deles no mosto ocorre principalmente durante o processo de mostura através da ação conjunta de enzimas degradantes de AXs, como as $\beta(1-4)$ -endoxilanas, as β -D-xilopiranosidas e as α -L-arabinofuranosidas (JAMAR, JARDIN e FAUCONNIER, 2011) e de enzimas do grupo cinamoil esterases que esterificam os AFs em ácidos fenólicos livres e solúveis.

2.4.2 Percepção sensorial e mecanismo de formação

Para serem sensorialmente perceptíveis em determinada bebida, as moléculas, em geral, precisam atingir valores mínimos de percepção sensorial (VMPS), que é a concentração da substância, em mg.L^{-1} , na qual seu sabor é detectável. Quanto menor o VMPS de um composto, mais fácil de detectá-lo (SPEEDING, AIKEN, 2015). Os ácidos fenólicos livres apresentam, geralmente, VMPS altos (em torno de 600 mg.L^{-1}), e não afetam o sabor da cerveja, porém suas concentrações são parâmetros importantes no processo, já que eles são os precursores dos CVAs que apresentam VMPS mais baixos. O 4VG, produto do AFC, por exemplo, tem VMPS de $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$, e é facilmente perceptível no sensorial da cerveja (CUI *et al.*, 2015).

A transformação do AFC em 4VG se dá pela reação de descarboxilação, ou seja, quando ocorre a remoção de uma molécula de CO_2 de suas estruturas. Ela pode ocorrer de duas maneiras ao longo do processo de produção de cerveja: por tratamento térmico a altas temperaturas e pela atividade enzimática em alguns tipos de microrganismos, como a levedura *Ale Saccharomyces cerevisiae*, também usada na fermentação de cervejas de trigo (Figura 2) (VANBENEDEN *et al.*, 2007).

Figura 3 – Descarboxilação térmica e enzimática do ácido ferúlico (**AFC**) em 4-viniguaiacol (**4VG**)



Fonte: Schwarz, Boitz, Methner, 2012.

Durante a mostura, a ocorrência da descarboxilação dos AFs em CVAs é inconclusiva com os dados estudados. De acordo com Coghe *et al.*(2004) e McMurrough *et al.* (1996), não há descarboxilação dos AFC em 4VG em temperaturas de mostura, abaixo de 80 °C. Já Granvogl e Langos (2016) apresentam resultados que comprovam, mesmo que em uma quantidade pequena, a ocorrência dessa reação na mostura, com valores de 62,8 µg.L⁻¹ e de 55,4 µg.L⁻¹ do 4VG, em dois mostos diferentes. Em contrapartida, em temperaturas mais altas, entre 90 a 100 °C, atingidas na etapa de fervura, todos os três autores tiveram a mesma conclusão de que a concentração do 4VG aumenta com o tempo, à medida que a concentração de seu precursor é reduzida.

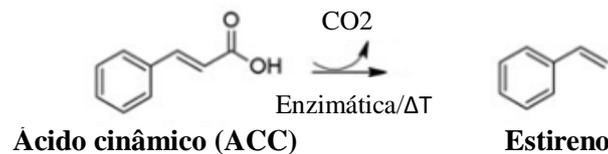
A habilidade em converter AFs em CVAs por descarboxilação enzimática está presente em alguns microrganismos como bactérias entéricas (GU *et al.*, 2011), bactérias lácticas (OKCU *et al.*, 2015), leveduras selvagens, como a *Brettanomyces bruxellensis* (MADSEN *et al.*, 2016) e as leveduras do tipo *Ale* (*Saccharomyces cerevisiae*) também usada na fermentação da Cervejas de Trigo (GRANVOGL, LANGOS, 2016). Ao contrário das leveduras do tipo *Lager*, as leveduras *Ale* possuem enzimas PAD1 (*phenylacrylic acid decarboxylase* ou fenil acrílico descarboxilase) e FDC1 (*ferulic acid decarboxylase* ou ácido ferúlico descarboxilase), responsáveis pela descarboxilação dos AFs durante a fermentação (MUKAI *et al.*, 2010).

2.4.3 Estireno e toxicologia

Da mesma forma que o 4VG, o estireno, molécula encontrada em vários tipos de alimentos, como, por exemplo, café, carne e canela, é um produto da descarboxilação do ácido cinâmico, também presente nos diversos maltes durante o

processo de produção de cerveja. A descarboxilação enzimática do ácido cinâmico em estireno (Figura 3) ocorre em paralelo com a do AFC pelas mesmas enzimas PAD1 e FDC1 presentes nas leveduras *A/e* (SCHWARZ, BOITZ, METHNER, 2012; SCHWARZ, STUBNER, METHNER, 2012).

Figura 4 – Descarboxilação térmica e enzimática do ácido cinâmico (**ACC**) em estireno



Fonte: Schwarz, Boitz, Methner (2012).

Durante uma conferência em Lion (França), 23 cientistas de 12 países avaliaram a carcinogenicidade do estireno e do 7,8-dióxido de estireno, metabolito do estireno. Ambos os compostos foram classificados no Grupo 2A, como provável carcinogênico a humanos, baseados na alta evidência de carcinogenicidade em experimentos animais, porém com evidências limitadas em experimentos humanos. Entretanto, alguns fatos deram maiores suportes a essas classificações. Primeiramente, foi evidenciado que o estireno é absorvido, distribuído e metabolizado rapidamente no organismo humano. Já o 7,8-dióxido de estireno tem a capacidade de se ligar covalentemente ao DNA, criando um aduto de DNA e dando início ao processo cancerígeno (Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), 2018).

2.5 PARÂMETROS DO PROCESSO

Alguns parâmetros do processo de produção de Cerveja de Trigo foram escolhidos com intenção de manter uma alta eficiência de processo, ou seja, mantendo controle dos parâmetros básicos, como a formação de açúcar (sólidos dissolvidos), o pH, o teor alcoólico e a viabilidade celular, além de otimizar a formação dos compostos fenólicos característicos para estilo de cerveja. Com base na literatura, os parâmetros variados foram a proporção dos maltes, a temperatura de mostura relacionada à extração dos AFs, a concentração inicial da levedura e a temperatura inicial de fermentação (SCHWARZ, BOITZ, METHNER, 2012; SCHWARZ, STUBNER, METHNER, 2012; GRANVOGL, LANGOS, 2016).

2.5.1 Proporção de maltes

No processo de produção de Cerveja de Trigo da Alemanha, os principais maltes usados são o de trigo (MT) e o de cevada (MC), com uma proporção de MT variando de 50 a 70% (STRONG, ENGLAND, 2015; PAPAZIAN *et al.*, 2017). Essa variação pode ter uma influência nos parâmetros de qualidade do processo devido às mudanças da composição química desses maltes. Geralmente, o malte de trigo possui uma maior concentração de proteínas comparado ao malte de cevada. Esse aumento faz com que haja um maior impedimento na hidratação das moléculas de amidos, já que elas estão presentes inicialmente englobadas por uma matriz proteica. Isso resulta, portanto, na redução da capacidade de atuação das amilases durante a mostura e, conseqüentemente, na extração dos açúcares fermentescíveis (JIN, ZHANG, DU, 2008). Sendo assim, existe a hipótese de que mostos produzidos com uma proporção maior de MT possuam uma menor concentração de açúcar e gerem cervejas com menores teores alcoólicos.

O conteúdo dos compostos fenólicos em maltes pode variar dependendo do processo de malteação, da condição climática do plantio do cereal, da maneira como é transportado até à produção cervejeira e, também, do tipo de malte usado (LENTZ, 2018). Então, a variação da proporção de maltes pode influenciar na formação dos CVAs. A Tabela 1 apresenta três estudos sobre a análise de diferentes ácidos fenólicos em malte de cevada (MC) e malte de trigo (MT).

Tabela 1 – Diferença na concentração de ácidos fenólicos em malte de cevada e malte de trigo

Referência	Matéria-prima	Ácido Fenólico	Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Gangopadhyay <i>et al.</i> (2016)	Grão de cevada	Ácidos ferúlico / cafeico / p-cumárico	277,7 / 4,8 / 2,1
Cai <i>et al.</i> (2015)	Malte de cevada	Ácidos ferúlico / p-cumárico	1,64 - 11,27 / 0,65 - 3,56
Langos <i>et al.</i> (2015)	Malte de cevada	Ácidos ferúlico / p-cumárico / cinâmico	2,76 / 1,31 / 1,15
	Malte de trigo	Ácidos ferúlico / p-cumárico / cinâmico	1,35 / 0,52 / 0,16

Fonte: O Autor, 2020.

De acordo com a Tabela 1, no estudo feito por Gangopadhyay *et al.* (2016), para grão de cevada, a concentração do AFC foi de $277,7 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso seco de

cevada, em comparação a 4,8 e 2,1 $\mu\text{g.g}^{-1}$ dos ácidos cafeico e p-cumárico, respectivamente. Já Cai *et al.* (2015) avaliaram 68 diferentes genomas de malte de cevada e obtiveram concentrações de AFC variando de 1,64 a 11,27 e de ácido p-cumárico (APC) de 0,65 a 3,56 $\mu\text{g.g}^{-1}$. Lango *et al.* (2015) analisaram tanto malte de cevada como malte de trigo. Para malte de cevada, os valores médios de AFC, APC e ácido cinâmico (ACC) foram de 2,76 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 1,31 e 1,15 $\mu\text{g.g}^{-1}$, respectivamente. E para malte de trigo, os valores foram de 1,35 $\mu\text{g.g}^{-1}$, 0,52 e 0,16 de ACC. Esses valores demonstram que, primeiramente, AFC tende a ser o ácido fenólico mais abundante entre esses maltes. Segundo o estudo de Langos *et al.* (2015), nas mesmas condições de malteação, de plantio e manuseio, em malte de trigo, a concentração de AFC é 8,44 vezes maior que a de ACC e, em malte de cevada, apenas 2,40. Em resumo, aumentando a proporção de malte de trigo, a cerveja tende a apresentar maiores concentrações do precursor do 4VG e menores do precursor do estireno.

A proporção de maltes também influencia a atividade enzimática durante a etapa de mostura. Coghe *et al.* (2004) estudaram mostos produzidos com 100% de malte de cevada, 70/30% malte de cevada/malte de trigo, 40/60% malte de cevada/malte de trigo, e 100% de malte de trigo, durante 1 hora de mostura e após a clarificação. Eles concluíram que em todos os mostos, a concentração de AFC aumenta durante a mostura e estabiliza durante a clarificação. Porém, os mostos com aumentos mais significativos foram os com maiores quantidades de MC. Uma possível explicação para isso é que malte de trigo possui proteínas inibidoras da enzima xilanase, degradante de AXs, o que reduz a extração dos ácidos fenólicos no mosto (DEBYSER, DELVAUX, DELCOUR, 1997; JAMAR, JARDIN e FAUCONNIER, 2011).

2.5.2 Temperatura e pH de mostura

A temperatura de mostura é um dos principais parâmetros do processo para otimização de performance enzimática, que influencia para melhorar a extração e a solubilização dos componentes dos maltes e, conseqüentemente, melhorar a atenuação fermentativa das leveduras. As diferentes enzimas do processo de mostura possuem faixas ótimas de temperatura, como a α -amilase (63 a 70 °C) e a β -amilase (55 a 65 °C) e, por elas terem uma diferente atuação na quebra das

estruturas moleculares dos amidos, é importante ativá-las separadamente para obter melhores rendimentos de extração de açúcares fermentescíveis e produção alcoólica durante a fermentação (PALMER, 2017).

Na produção de Cerveja de Trigo, também é importante avaliar a faixa de temperatura ótima das enzimas responsáveis pela liberação dos AFs durante a mostura. Para o AFC, alguns estudos obtiveram conclusões similares dessa temperatura ótima (Tabela 2).

Tabela 2 – Temperatura ótima para extração de ácidos fenólicos na etapa de mostura

Referência	Ácido fenólico	Temperatura ótima (°C)
Mcmurrough <i>et al.</i> (1996)	AFC	45
Coghe <i>et al.</i> (2004)	AFC	45
Schwarz, Boitz, Methner (2012)	AFC e ACC	45
Vanbeneden <i>et al.</i> (2008b)	AFC	40
Cui <i>et al.</i> (2015)	AFC	44

Fonte: O Autor, 2020.

Mcmurrough *et al.* (1996) concluíram que, a 45 °C, há uma maior atividade da enzima feruloil esterase, responsável pela extração desse AF e que, a 65 °C, ocorre sua desnaturação. Coghe *et al.* (2004) também obtiveram 45 °C como valor ótimo, atribuindo esse resultado ao aumento da ação combinada de enzimas que degradam AXs e enzimas que liberam AFCs nessa temperatura. Schwarz, Boitz, Methner (2012), além de obterem esse valor ótimo para o AFC, concluíram, que, nessa mesma temperatura, também há uma maior liberação de ácido cinâmico (ACC), com reduções a partir de 65 °C, o que sugere que a enzima cinamoil esterase desnatura na mesma temperatura de desnaturação da feruloil esterase. Outras temperaturas também foram obtidas como ótimas: Vanbeneden *et al.* (2008b), 40 °C e Cui *et al.* (2015) definiram 44 °C, gerando certa inconclusão e uma necessidade de novas investigações para uma conclusão mais segura na escolha desse parâmetro.

O parâmetro de pH, da mesma forma que a temperatura de mostura, possui valores ótimos para a atividade dessas enzimas (Tabela 3).

Tabela 3 – pH ótimo para as enzimas α -amilase, β -amilase, feruloil esterase e cinamoil esterase

Referência	Enzimas	pH ótimo
Mosher, Trantham (2016)	α -amilase e β -amilase	5,4 – 5,8
Vanbeneden <i>et al.</i> , (2008b)	Feruloil esterase	5,8
Schwarz, Boitz, Methner (2012)	Feruloil esterase e cinamoil esterase	5,4 - 6,6 e pH neutro

Fonte: O Autor, 2020.

De acordo com a Tabela 3, a faixa ótima para extração de açúcares fermentescíveis pelas enzimas α -amilase e β -amilase é de 5,4 e 5,8 (MOSHER, TRANTHAM, 2016). Já segundo Vanbeneden *et al.*, (2008b), o pH ótimo para extração de AFC é de 5,8 devido à maior atividade da enzima feruloil esterase. Schwarz, Boitz, Methner (2012) obtiverem uma faixa de pH ótimo entre 5,4 e 6,6 em relação a extração do AFC, e concluíram que a extração do ACC é favorecida com o aumento de pH, ou seja, em valores neutros de pH.

2.5.3 Tempo de fervura

Durante a fervura, parte dos AFs são transformados em seus respectivos CVAs pela reação de descarboxilação térmica. De acordo com Coghe *et al.* (2004), a formação de 4VG aumenta com o tempo de fervura, atingindo, aproximadamente, o VMPS após 3 horas. Entretanto, parte do 4VG também evapora junto com outros componentes voláteis, reduzindo a concentração em tempos excessivos. Langos *et al.* (2016), ao avaliar a formação de 4VG e estireno durante a fervura, concluíram que a descarboxilação térmica é mais eficiente nessa etapa do que na mostura devido às maiores temperaturas. Eles apresentaram também que ocorre uma maior formação de 4VG comparado à de estireno.

2.5.4 Tipos e concentração inicial de levedura

Existem dois grupos principais de leveduras usadas na produção dos tipos de cervejas mais conhecidas: leveduras de baixa fermentação ou leveduras do tipo Lager (*Saccharomyces pastorianus*) e leveduras de alta fermentação ou leveduras do tipo Ale (*Saccharomyces cerevisiae*), da qual a levedura usada na Cerveja de Trigo faz parte. Essas leveduras diferem em alguns pontos importantes. As

leveduras do tipo *Lager* fermentam em temperaturas iniciais consideradas baixas, em torno de 12 °C, resultando em uma fermentação mais lenta e, geralmente, floculam e decantam facilmente no final da fermentação primária. Já as leveduras do tipo *Ale* fermentam em temperaturas mais elevadas, em torno de 20 °C, resultando em uma fermentação mais vigorosa e não floculam bem, tornando a cerveja mais turva (KUNZE, 2010).

Essas leveduras também são diferentes em relação à formação de subprodutos de fermentação. Enquanto as *Lager* são conhecidas por não ter concentrações significativas de compostos que geram características sensoriais a cerveja, as *Ale* geram diferentes tipos de subprodutos, como ésteres, aldeídos, fenólicos etc., como as leveduras utilizadas na produção de Cerveja de Trigo. Essas leveduras são *phenolic off-flavor* positivo (Pof⁺), que significa que elas são capazes de gerar compostos fenólicos. De acordo com Vanbeneden *et al.* (2008a), essas leveduras possuem a enzima fenil acrílico ácido descarboxilase (PAD1) e ácido ferúlico descarboxilase (FDC1), que, por uma ação conjunta, são responsáveis pela transformação do AFC em 4VG.

A concentração inicial de levedura também tem influência na performance de fermentação. Foi visto que, ao elevar a concentração de células no início da fermentação, há uma maior eficiência na taxa de consumo de açúcar e produção de álcool ao longo do tempo. Isso porque, a taxa de redução de extrato de açúcar, denominada pelos autores de poder de fermentação, aumentou com a elevação da concentração de levedura de 10, 20, 40, 80 e 120x10⁶ células.ml⁻¹ (VERBELEN *et al.*, 2008).

Em relação ao estireno, foi encontrado que há uma tendência no aumento desse composto com o aumento da concentração inicial de células de leveduras. Schwarz, Boitz, Methner (2012), ao reproduzir três fermentações em condições idênticas, mas com diferentes concentrações iniciais de levedura (4,6, 8,5 e 12,2x10⁶ células.ml⁻¹), observou uma maior diferença do estireno se comparar o mosto fermentado com 4,6 milhões de células.ml⁻¹ com os outros dois, 8,5 e 12,2 milhões de células.ml⁻¹. Com esse resultado, é possível que a formação do 4VG deva ter uma mesma tendência e precisa ser investigado.

2.5.5 Temperatura de fermentação

A temperatura de fermentação, além de ser um parâmetro que impacta na atenuação celular, também influencia na formação dos CVAs. Cui *et al.* (2015), fizeram a avaliação do aumento de temperatura de fermentação (16, 18 e 20 °C) em mostos produzidos com os mesmos parâmetros de produção na formação de 4VG. Eles concluíram que a concentração de 4VG aumenta com o aumento da temperatura de fermentação devido à maior atividade da enzima feruloil esterase causada por essa variação.

Schwarz, Stubner, Methner (2012) avaliaram a variação dos ácidos ferúlico (AFC), p-cumárico (APC) e cinâmico (ACC), e dos CVAs, 4VG e estireno ao longo de 7 dias de fermentação em duas temperaturas diferentes, 16 e 25 °C. Nesse estudo, foi visto que em ambas as temperaturas, as concentrações de AFC e APC são reduzidas gradativamente ao longo da fermentação e que a concentração de ACC é reduzida quase que completamente logo no primeiro dia. Dessa forma, enquanto que o 4VG foi formado aos poucos durante a fermentação até chegar no máximo apenas no sexto dia, o estireno foi formado já no primeiro dia, reduzindo nos dias subsequentes por volatilização. Os autores também viram que o aumento da temperatura acelerou esse perfil, principalmente na redução do ACC e produção do estireno no início da fermentação.

3 METODOLOGIA

Para obter um melhor desenvolvimento e compreensão, o trabalho foi realizado em três etapas. Nas etapas 01 e 02 foi aplicado o planejamento de experimento. Etapa 01: Análise de brassagem (mostura, clarificação e fervura), usando um equipamento de bancada, parâmetros analisados: proporção dos maltes de trigo e de cevada e temperatura de mostura para extração de ácidos fenólicos, chamada de descanso ácido. Etapa 02: Escalonamento e automatização da brassagem com os parâmetros da etapa anterior. Etapa 03: Fermentação: parâmetros analisados: a concentração inicial de células de levedura e a temperatura inicial de fermentação. Os resultados de extrato de sólidos dissolvidos, pH e presença dos precursores de 4VG e estireno (ácidos ferúlico e cinâmico, respectivamente) foram analisados utilizando um programa de análise estatística.

3.1 PRIMEIRA ETAPA

Nessa etapa, foi aplicada a ferramenta de planejamento experimental 2^2 mais 3 ensaios nos níveis centrais. A Tabela 4 apresenta os parâmetros independentes escolhidos em cada nível, escolhidos com base nos guias de cerveja (STRONG, ENGLAND, 2015; PAPAZIAN *et al.*, 2017) e nos estudos literários do item 2.4.2 (MCMURROUGH *et al.*, 1996; COGHE *et al.* 2004; SCHWARZ, BOITZ, METHNER, 2012; VANBENEDEN *et al.*, 2008b; CUI *et al.*, 2015).

Tabela 4 – Tabela de níveis do planejamento experimental da etapa de brassagem

Tabela de nível da primeira etapa			
Parâmetro	Níveis		
	-	0	+
Proporção de maltes (%MT)	50	60	70
Temperatura (°C)	40	45	50

A proporção de maltes de trigo/cevada (MT/MC) possui valores limites de 50/50% (-) e de 70/30% (+) e ponto central de 60/40% (0), e a temperatura do descanso ácido possui valores limites de 40 °C (-) e de 50 °C (+) e ponto central de 45 °C (0). Dessa forma, foram realizados, ao todo, 7 ensaios aleatoriamente (4 nos limites e 3 nos pontos centrais). Para cada ensaio, foram extraídas 6 amostras, três durante a mostura (na metade de cada rampa de mostura) e mais três nos tempos

de 60, 85 e 90 minutos de fervura, com o intuito de avaliar a cinética da descarboxilação térmica.

3.1.1 Brassagem

Para a produção do mosto, usou-se uma manta térmica (marca Edutec, Brasil). Esse equipamento possui um regulador de potência eletrônico manual para elevação e controle da temperatura do mosto (Figura 5). No início da mostura de cada brassagem, adicionou-se 350 ml de água destilada em um béquer de 600 ml. Assumindo-se uma razão de volume de água e peso de malte de $3,5 \text{ L.kg}^{-1}$, a quantidade total de malte adicionado é de 100 g. Dessa forma, de acordo com o planejamento apresentado na Tabela 3, os maltes foram divididos em 50/50, 60/40 e 70/30 (MT/MC em peso por g) para os níveis inferior, central e superior, respectivamente.

Figura 5 – Manta térmica (Edutec, Brasil) usada para controle de temperatura durante a mostura e a fervura



Fonte: O Autor, 2021.

3.1.1.1 Moagem

Os maltes foram primeiramente pesados através de uma balança analítica da marca BEL, e, em seguida, moídos a seco com um moedor manual da marca Araceba (Figura 6). Nessa etapa, teve-se o cuidado de manter o padrão de moagem constante, ou seja, homogeneidade do tamanho dos grãos em cada ensaio, controlando-se o espaçamento do moedor.

Figura 6 – Moedor manual a seco (Araceba, Brasil)



Fonte: O Autor, 2021.

3.1.1.2 Mostura

As condições de temperatura da mostura estão apresentadas na Tabela 5. Foram selecionadas quatro rampas de temperatura: a primeira é o descanso ácido, parâmetro de temperatura variado nos ensaios; as próximas duas são as rampas das enzimas β -amilase e α -amilase, responsáveis pela extração dos açúcares e a última é a rampa chamada de *mash-out*, utilizada para desativação enzimática para não haver mais modificação do perfil de açúcares. Todas as rampas foram escolhidas de acordo com MOSHER, TRANTHAM, 2016; MCMURROUGH *et al.*, 1996; COGHE *et al.* 2004; SCHWARZ, BOITZ, METHNER, 2012; VANBENEDEN *et al.*, 2008b; CUI *et al.*, 2015 e foram mantidas por 10 minutos para que essa etapa não durasse muito tempo.

Tabela 5 – Cronograma em minutos das rampas de mostura com o descanso ácido, as sacarificações de β -amilase e α -amilase e a desativação enzimática (*mash-out*)

Rampas de mostura	Temperatura (°C)		
Descanso ácido	40	45	50
β -amilase	64		
α -amilase	70		
"Mash out"	77		

Ao adicionar os maltes, que estão em temperatura ambiente (em torno de 27 °C, no caso do laboratório), à água aquecida, a temperatura do sistema naturalmente reduz. Dessa forma, para que a mostura seja iniciada na temperatura exata da primeira rampa (descanso ácido), é necessário que a temperatura inicial da

água esteja um pouco acima da temperatura dessa rampa. Esse valor de temperatura foi calculado através da Equação 1 (PALMER, 2017).

$$T_W = \left[\left(\frac{S}{R} \right) \times (T_2 - T_1) \right] + T_2 \quad (1)$$

Na qual: T_W é a temperatura inicial da água;

T_1 é a temperatura dos maltes secos (temperatura ambiente);

T_2 é a temperatura da primeira rampa (que depende do ensaio);

S é a capacidade de calor do grão em relação à água (40% ou 0,4 de acordo com Palmer, 2017);

R é a razão peso de água e peso de maltes

Sendo, $R = R_V \times \rho$;

R_V é a razão volume de água e peso de maltes (3,5 L/kg) e

ρ é a densidade da água (0,985 kg.L⁻¹).

3.1.1.3 Clarificação

Após o final da mostura, iniciou-se a clarificação. Nessa etapa, o resíduo sólido foi separado do mosto com auxílio de uma peneira e, em seguida, lavado com 350 ml de água a 77 °C para aumentar o rendimento de extração dos açúcares remanescentes e controlar o volume do mosto. O mosto foi, então, transferido para outro béquer de 600 ml para iniciar a fervura.

3.1.1.4 Fervura

O mosto resultante foi levado à fervura (100 °C) utilizando a manta térmica da Figura 5 (marca Edutec, Brasil). Nessa etapa, foram retiradas três amostras após o início da fervura (60, 75 e 90 minutos) para avaliar a descarboxilação térmica. Optou-se por não adicionar lúpulo nessa primeira etapa já que ele não é um dos parâmetros a ser analisado no experimento.

3.2 SEGUNDA ETAPA

3.2.1 Brassagem

A brassagem da segunda etapa foi realizada em um equipamento elétrico com controle automático de temperatura de escala superior de 10 litros (Modelo Braumeister, Alemanha). Esse equipamento possui um sistema de resistências internas para aquecimento, um sistema de bombeamento para homogeneização do mosto e um sensor de temperatura conectado a um leitor digital (Figura 7). A Figura A1 do APÊNDICE A apresenta esquematicamente o funcionamento do equipamento em todas as etapas da brassagem, desde a adição dos maltes moídos até o resfriamento do mosto a ser fermentado. Durante a etapa de brassagem foram retiradas 3 amostras de 10 ml durante a fervura nos tempos de 60, 75 e 90 minutos, exatamente como foi feito na primeira etapa do projeto para comparar os resultados de extração de açúcares e de formação dos CVAs.

Figura 7 – Equipamento de 10 litros, digital e automático, e seus componentes internos (marca Braumeister, Alemanha)



- Resistencia para aquecimento
- Sensor de temperatura
- Entrada e saída bomba para homogeneização

Foi verificado que para que o sistema de recirculação interno desse equipamento funcione, o volume de água no início da mostura deve ser no mínimo 10,8 L. Além disso, para não sobrecarregar o compartimento interno e para que todas as etapas fluam adequadamente, escolheu-se colocar 2,4 kg de malte (sendo dividido nas mesmas proporções da etapa anterior), resultando em uma taxa de diluição de 4,5 L.kg⁻¹.

3.3 TERCEIRA ETAPA

Nessa etapa de fermentação/maturação foi um fatorial simples 2^2 . A Tabela 6 apresenta os dois parâmetros independentes variados e controlados e seus níveis inferior e superior. Os níveis da concentração inicial de leveduras foram escolhidos de acordo com a indicação de Palmer (2017) para cervejas do tipo *Ale*, como a Cerveja de Trigo e os níveis da temperatura de fermentação foram definidos com base na Folha de Dados Técnicos da levedura utilizada WB-06 (FERMENTIS, 2017).

Tabela 6 – Tabela de níveis do planejamento experimental da etapa de fermentação

Tabela de nível da segunda etapa		
Parâmetro	Níveis	
	-	+
Concentração inicial de células (bilhão.brix ⁻¹ .L ⁻¹)	0,5	1
Temperatura inicial de fermentação (°C)	18	24

Os níveis inferior e superior para cervejas de trigo (*Ale*) da concentração inicial de células de levedura (*Pitching Rate*) são de 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (-) e 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (+), respectivamente, e os níveis inferior e superior da temperatura inicial de fermentação são de 18 °C (-) e 24 °C (+). Nesta etapa, foram usados os mostos de ensaios com melhores eficiências de brassagem.

3.3.1 Fermentação, maturação, carbonatação e envase

Foram usados 4 recipientes de vidro de capacidade total de 1,2 L cada, no qual foi adicionado 1 litro em cada, totalizando 4 litros dos 10 litros produzidos. Os recipientes possuem duas saídas na tampa, uma destinada à liberação de CO₂, produzido pela fermentação, e a outra para retirada de amostra usando-se seringa (Figura 8). O restante do volume foi transferido para um fermentador maior com capacidade total de 12 litros para não haver desperdício.

Figura 8 – Recipiente caseiro usado como fermentador



Fonte: O Autor, 2021.

Previamente à adição da levedura, foi necessário realizar a oxigenação do mosto. Isso foi feito com o uso de um cilindro de oxigênio medicinal de 10 m³, obtido da White Martins, que possui uma válvula de controle de vazão, na qual é ajustada e mantida constante para todos os ensaios. A levedura usada foi a WB-06, bastante comum na produção de Cerveja de Trigo e conhecida por gerar características fenólicas à cerveja, ou seja, ser Pof⁺ e formar 4-vinilguaiacol em concentração considerável, como indicado pela Ficha técnica da empresa produtora (FERMENTIS, 2017).

Após a inoculação da levedura, a fermentação primária se estenderá por 4 dias, nas temperaturas de 18 e 24 °C, e, em seguida, a cerveja ficará por mais 4 dias de maturação até ser envasada. Para que a cerveja fique pronta, é necessário realizar a sua carbonatação. Nesse caso, foi escolhido o uso do método de Primming, que consiste na adição de uma quantidade predeterminada de açúcar que será metabolizada pelas leveduras ainda presentes no meio, em temperatura entre 20 e 30 °C, por uma semana. De acordo com Palmer (2017), a estimativa para uma carbonatação de 2,5 volumes CO₂ (quantidade considerada apropriada para vários estilos de cerveja) utilizando açúcar de cana-de-açúcar em 19 L de cerveja a 21 °C e 1 atm, é de 113g. Então, usando uma garrafa que comporta 350 ml de cerveja foi estimado, aproximadamente, 2g de açúcar. Ao longo dos 8 dias de fermentação/maturação foram retiradas 6 amostras, uma a cada 24 horas durante os 4 dias de fermentação primária, uma no início da maturação (dia 5) e uma no final, anterior ao envase (dia 8).

3.3.2 Controle dos parâmetros de fermentação

3.3.2.1 Concentração inicial de leveduras

O parâmetro de concentração inicial de leveduras, ou *Pitching Rate* é usado em termos de quantidade de células viáveis, em bilhão, por brix e por mililitro (Palmer, 2017). Com ele, pôde-se calcular a quantidade de células viáveis necessárias, em bilhão, para fermentar um mosto com valores pré-determinados de volume e de ESD (Equação 2).

$$Qt. \text{ de células viáveis (bilhão)} = Pitching \text{ Rate} \times V_{\text{mosto}} \times OE(\text{brix}) \quad (2)$$

Para este Projeto em específico, o V_{mosto} de cada fermentação foi de 1 L e o ESD, ou extrato original (OE), foi obtido com a medição do refratômetro no final da fervura de cada mosto.

Após calcular a quantidade de células viáveis necessárias para as fermentações dos mostos dos dois ensaios, foi feita a análise da concentração de células de levedura (cel.g^{-1}) do pacote WB-06. Para isso, foram realizadas as técnicas de diluição seriada e de contagem de levedura por meio de um microscópio da marca QUIMIS, através da metodologia explicada no item 3.4.3 deste artigo.

Então, com esses dois valores determinados, pôde-se calcular o peso de células de levedura do pacote WB-06, em gramas, adicionado em cada fermentação (Equação 3).

$$Peso \text{ de células (g)} = \frac{Qt. \text{ de células viáveis (bilhão)}}{Concentração \text{ de células viáveis (cel.g}^{-1})} \quad (3)$$

Sendo, “*Qt. de células viáveis (bilhão)*”, referente ao número de células de levedura viáveis necessárias pela variação de *Pitching Rate* e

“*Concentração de células viáveis (cel.g⁻¹)*”, referente ao valor de concentração de células viáveis do pacote WB-06 de levedura usado.

3.3.2.2 Temperatura inicial de fermentação

Para o controle de temperatura, dois recipientes como o da Figura 8 foram colocados em um freezer a 18 °C e outros dois em um frigobar a 24 °C (Figura 9).

Essas temperaturas foram controladas com o uso de dois termostatos acoplados aos equipamentos com uma histerese de 1 °C (diferencial de temperatura) para cima e para baixo.

Figura 9 – Recipientes e equipamentos utilizados para a realização da etapa de fermentação



Fonte: O Autor, 2021.

3.4 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

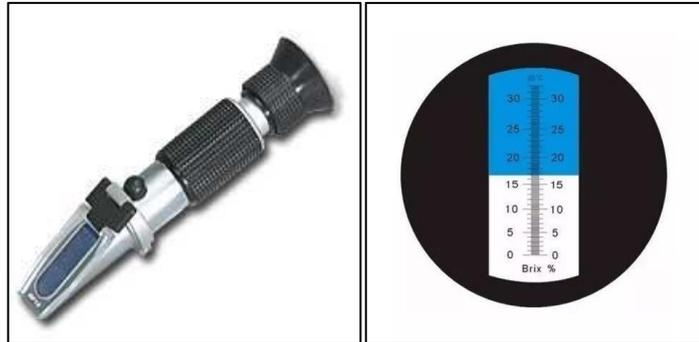
As amostras retiradas durante a brassagem foram analisadas quanto ao extrato ESD, ao pH e à presença de compostos fenólicos, ácido ferúlico e ácido cinâmico. Já as amostras durante a fermentação, além desses três parâmetros, também foram analisadas quanto ao teor alcoólico e à viabilidade celular.

3.4.1 Extrato de sólidos dissolvidos e teor alcoólico

Para a medição do extrato de sólidos dissolvidos foi usado um refratômetro de mão (Figura 10). As medidas são apresentadas na escala brix, bastante comum na indústria de vinho, suco e açúcar. Devido ao fato desse aparelho ter sido construído e calibrado para medições de soluções simples de sacarose, devido ao mosto de cerveja pré-fermentação ser uma solução mais complexa de sólidos dissolvidos e devido a cerveja pós-fermentação apresentar álcool, as medições do refratômetro precisam ser ajustadas.

Para mostos anteriores à fermentação, ou seja, que não tem álcool presente, simplesmente, divide-se o valor medido por um fator de correção, que é específico para cada refratômetro, mas que para essa pesquisa tem o valor padrão de 1,04 (KAI, 2012).

Figura 10 – Refratômetro e escala brix



Fonte: Imagens do Google, 2021.

Já para valores medidos de cerveja pós-fermentação, a presença de álcool altera o índice de refração medido no refratômetro ainda mais. Para prever essa variação, Terrill (2012), ao usar 68 triplicatas independentes de 8 diferentes cervejarias de mostos de pós-fermentação, construiu uma regressão cúbica (Equação 4) entre a densidade relativa final (FG) e as medições iniciais e finais do refratômetro em Brix, RI_i e RI_f respectivamente, chamado pelo autor de índices de refração, tornando-se possível o ajuste das medições.

$$FG = 1,0000 - 0,0044993 \times RI_i + 0,011774 \times RI_f + 0,00027581 \times RI_i^2 - 0,0012717 \times RI_f^2 - 0,0000072800 \times RI_i^3 + 0,000063293 \times RI_f^3 \quad (4)$$

Antes de entender a metodologia para se calcular o teor alcoólico de uma cerveja, é importante saber e diferenciar dois acrônimos usados no cálculo: extrato original e extrato aparente. Extrato original (OE) é a medida de peso de extrato de sólidos dissolvidos em referência ao peso da água, em graus Plato ou Brix, do mosto no final da fervura, ou início de fermentação; extrato aparente (AE) é a medida de peso de extrato de sólidos dissolvidos em referência ao peso da água, medidos durante a fermentação. Cutaia, Reid, Speers (2009) apresentam, em seu artigo, duas maneiras de calcular o teor alcoólico por peso ($A_{w/w}$) a partir de medidas de OE e AE. Delas, a Equação 5 é concluída como a que apresenta melhor ajuste dos dados usados devido ao seu menor valor de erro-padrão estimado, e, por esse motivo, ela foi a escolhida.

$$A_{w/w}/(OE - AE) = b_{a0} + (b_{a1} \times OE) \quad (5)$$

Sendo os coeficientes $b_{a0} = 3,72 \times 10^{-1}$ e $b_{a1} = 3,57 \times 10^{-3}$ estimativas da interseção e inclinação de coeficientes das equações de Balling chamadas de “*brewing values*” pelos autores.

Em seguida, os valores de $A_{w/w}$ são convertidos para teor alcoólico por volume ($A_{v/v}$ ou ABV) através da Equação 6.

$$A_{w/w} = \frac{A_{v/v} \times 0,7907}{SG} \text{ ou,}$$

$$A_{v/v} = \frac{(A_{w/w} \times SG)}{0,7907} \quad (6)$$

Em todos os cálculos deste projeto, para converter de SG para extrato de sólidos dissolvidos (°brix) e vice-versa, são usadas as Equações 7 e 8, respectivamente, encontradas também em Cutaia, Reid e Speers (2009).

$$SG - 1 = 1,308 \times 10^{-5} + 3,868 \times 10^{-3} \times \text{extrato} + 1,275 \times 10^{-5} \times \text{extrato}^2 + 6,300 \times 10^{-8} \times \text{extrato}^3 \quad (7)$$

$$\begin{aligned} \text{extrato} = & 2,569 \times 10^2 \times (SG - 1) + 6,7126 \times 10^0 \times (SG - 1)^2 - 1,4482 \times 10^4 \times \\ & (SG - 1)^3 + 5,1758 \times 10^5 \times (SG - 1)^4 - 1,0746 \times 10^7 \times (SG - 1)^5 + 1,3011 \times 10^8 \times \\ & (SG - 1)^6 - 8,5079 \times 10^8 \times (SG - 1)^7 + 2,3231 \times 10^9 \times (SG - 1)^8 \end{aligned} \quad (8)$$

3.4.2 pH

Os pHmetros utilizados na primeira e na segunda etapas foram o TECNOPON, modelo mPA-210 e o HANNA *Instruments*, modelo HI99151 (específico para produção de cerveja com compensação automática de temperatura) (Figura 11).

Figura 11 – pHmetros das marcas TECNOPON e HANNA *Instruments*, respectivamente

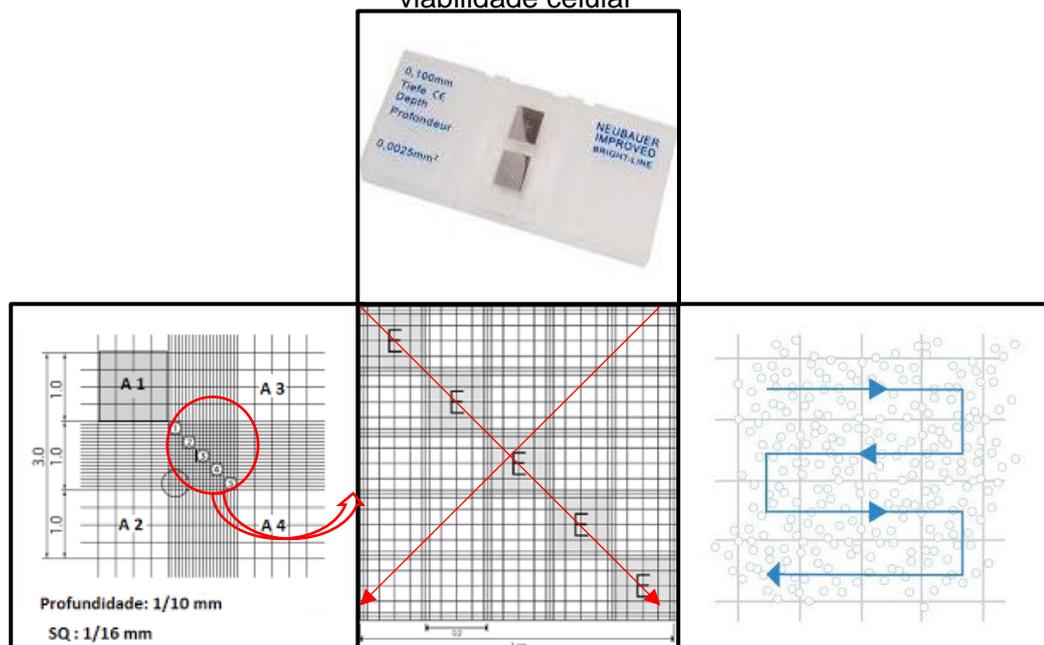


Fonte: Imagem do Google, 2021.

3.4.3 Viabilidade celular

Para o cálculo de viabilidade celular, utiliza-se um microscópio biológico da marca QUIMIS, modelo Q7708S-L, Câmara de Neubauer, lamínula, solução de azul de metileno com concentração de 0,02%, para contrastar as células mortas das vivas. A Figura 12 apresenta a metodologia de contagem de células. A Câmara de Neubauer possui duas regiões tracejadas (primeira imagem), cada uma possuindo 9 quadrantes de área de 1 mm², como mostrado na segunda imagem. Para a contagem de células de levedura, utiliza-se o quadrante central, que possui outros 25 quadrados menores, cada um com 16 quadrantes (terceira imagem). Para padronizar a técnica de contagem de células, seguem-se estas regras de contagem: 1. Escolher os 10 quadrantes das diagonais; 2. Contar cada quadrante na direção indicada pelas setas; 3. Células localizadas nas linhas superior e esquerda são contadas e, nas linhas inferior e direita, não são, e 4. Duas células unidas são admitidas como uma. Após contar as células vivas (incolores) e mortas (azuis) dos 10 quadrantes, utilizam-se as Equações 9 e 10 para calcular a concentração celular (cel.ml⁻¹) e a viabilidade (%). Os objetivos desse teste foram indicar a condição inicial do insumo e avaliar se há manutenção da sua viabilidade ao longo da fermentação e maturação.

Figura 12 – Câmara de Neubauer e metodologia de contagem de células e determinação de viabilidade celular



Fonte: Imagens Google, 2021.

$$\text{Concentração celular (cel. ml}^{-1}\text{)} = n_T \times 25000 \times T_d \quad (9)$$

Sendo, n_V = número total dos 10 quadrantes

T_d = taxa de diluição (1: 10.000)

25000 referem-se ao volume dos 10 quadrantes lidos em ml.

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{N_V}{N_T} \times 100\% \quad (10)$$

Sendo, n_V = número total de células vivas

n_T = número total de células vivas e mortas

3.4.4 Análise da presença de AFs por cromatografia líquida

Para determinação dos ácidos fenólicos ferúlico e cinâmico, precursores do 4VG e estireno, respectivamente, utilizou-se o equipamento de cromatografia líquida de alta performance (HPLC), modelo YL9100 (ALLCROM) e a metodologia (Tabela 7).

Tabela 7 – Parâmetros cromatográficos de HPLC usado para análise dos ácidos fenólicos

Características	Condições
Operação	Amostras previamente filtradas com um filtro de seringa MILLEX-GV de PVDF com poros de 0,22 µm. Sistema de bombeamento das fases móveis usando uma bomba quaternária. Injeção automática de amostras
Coluna	C18 (PHENOMENEX, 10 cm x 10 mm)
Detector	UV-VIS
Comprimento de onda	280 e 330 nm
Temperatura da coluna	40 °C
Volume de injeção	100 µl
Fluxo	0,4 mL.min ⁻¹
Fase móvel A	ácido fórmico:acetonitrila:água (0,5:12,5:87)
Fase móvel B	ácido fórmico:acetonitrila:água (10:50:40)

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ferramenta de planejamento experimental fatorial linear foi usada para definir as condições de processo como apresentado na Tabela 4. Em seguida, foi feita uma regressão linear de primeira ordem com três coeficientes (Equação 11).

$$Y_k = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_{12} x_1 x_2 \quad (11)$$

Sendo, Y_k , a variável resposta ($Y_1 = brix$; $Y_2 = pH$);

x_1 e x_2 , as variáveis independentes de proporção de MT/MC e temperatura de mostura, respectivamente;

β_0 , o coeficiente da média de todas as respostas;

β_1 e β_2 , os coeficientes de regressão lineares;

β_{12} , o coeficiente de regressão de interação entre os fatores.

Para cada resposta, foi realizado o Teste F para determinar se o modelo é preditivo (sendo preditivo quando o valor de F experimental for maior que o F tabelado). Além disso, utilizou-se o coeficiente de determinação (R^2) em um nível de confiança de 95%, para determinar se os valores experimentais são significativos e que se ajustam ao modelo. Os resultados dos testes foram gerados pelo Software Statística StatSoft versão 5 e apresentados nas tabelas ANOVA.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRIMEIRA ETAPA

Para cada ensaio, as 6 amostras retiradas ao longo da brassagem foram analisadas quanto ao extrato de sólidos dissolvidos, ESD, (°brix) e ao pH. De acordo com o planejamento apresentado no item 3.1, essa etapa teve 7 ensaios de brassagem, gerando um total de 42 amostras retiradas. As amostras da fervura também foram analisadas em relação à presença dos ácidos ferúlico e cinâmico, que são indicadores da formação dos seus respectivos CVAs, 4VG e estireno.

4.1.1 Extrato de sólidos dissolvidos

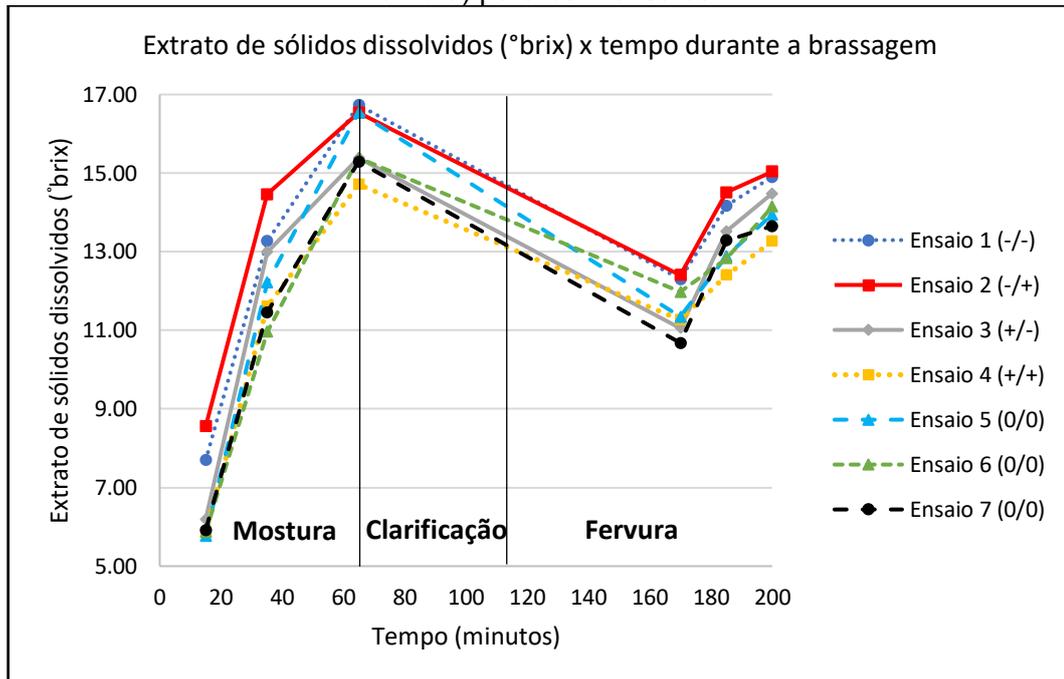
Na primeira etapa, os valores medidos de ESD (°brix) foram corrigidos de duas maneiras para ajustar erros de medição. Um desses erros envolve a variação da evaporação do mosto durante a brassagem entre os ensaios (APÊNDICE B). O segundo erro é referente à própria medição do refratômetro. Então, após esses ajustes, foram tabelados os valores de ESD das 42 amostras dessa etapa (Tabela 8).

Tabela 8 – Valores de ESD (°brix) corrigidos das 6 amostras nos tempos de 15, 35, 65, 170, 185 e 200 para o planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais

Ensaio	Parâmetros		ESD (°brix)					
	P (%MT)	T (°C)	Tempo de retirada de amostra (min)					
			15	35	65	170	185	200
1	- (50)	- (40)	7,69	13,27	16,73	12,30	14,17	14,90
2	- (50)	+ (50)	8,56	14,46	16,54	12,40	14,51	15,04
3	+ (70)	- (40)	6,20	12,99	15,39	11,06	13,52	14,48
4	+ (70)	+ (50)	5,87	11,61	14,71	11,27	12,40	13,27
5	0 (60)	0 (45)	5,77	12,21	16,54	11,35	12,89	13,94
6	0 (60)	0 (45)	5,87	10,96	15,39	11,98	12,83	14,15
7	0 (60)	0 (45)	5,92	11,46	15,29	10,67	13,29	13,65

Assim, com esses valores ajustados, o perfil de ESD ao longo da brassagem dos 7 ensaios estão apresentados na Figura 13. Como de acordo com os itens 3.1.2.1 e 3.1.2.2 da metodologia, o gráfico está dividido em três etapas: mostura, na qual foram retiradas as 3 primeiras amostras, nos tempos de 15, 35 e 65 minutos, clarificação (e tempo levado para aquecimento do mosto), entre 65 e 170 minutos, e fervura, que também foram retiradas 3 amostras, nos tempos de 170, 185 e 200 minutos, respectivamente.

Figura 13 – Perfil da evolução ESD (°brix) durante a brassagem (mostura, clarificação e fervura) para os 7 ensaios



(-/-): 50/50 MT/MC; T = 40 °C; (-/+): 50/50 MT/MC; T = 50 °C; (+/-): 70/30 MT/MC; T = 40 °C

(+/+): 70/30 MT/MC; T = 50 °C; (0/0): 60/40 MT/MC; T = 45 °C

De uma forma geral, os perfis de ESD em função do tempo/etapa de processo mostraram-se semelhantes entre si. Na mostura houve um aumento do ESD, relacionado à extração dos açúcares pelas enzimas, como as α e β -amilases; na etapa de clarificação, houve uma redução pois, nesse momento, foi adicionado água para lavagem dos maltes e na etapa de fervura, o ESD aumenta devido à evaporação da água e concentração do mosto.

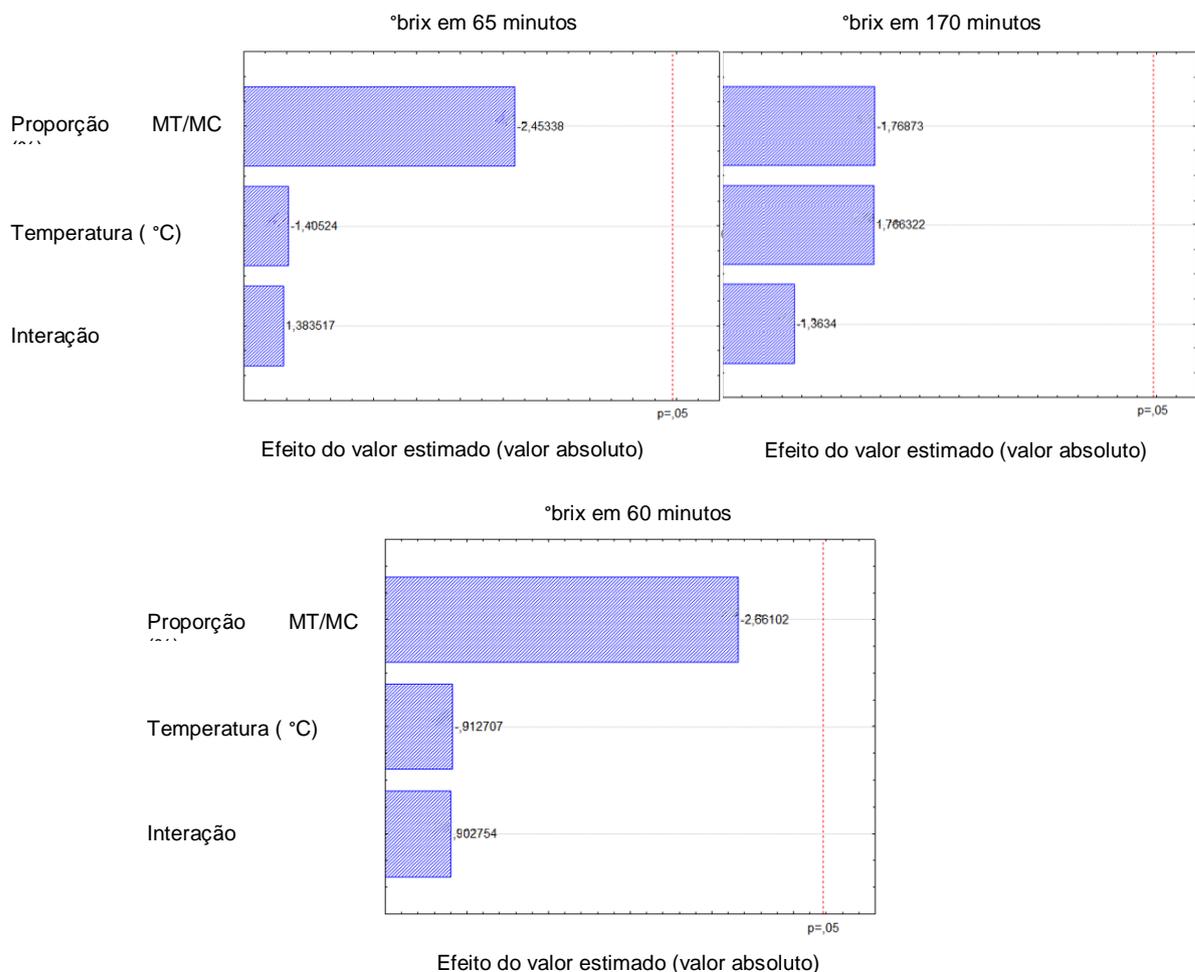
Também se percebe, pela Figura 13, que os Ensaios 1 e 2, com proporções de MT/MC de 50/50, foram o que apresentaram maiores valores de ESD, do começo ao fim da brassagem. Já, na comparação da mudança da temperatura de descanso ácido de 40 para 50 °C, os valores são bem próximos. Esse fato pode ser indicativo de uma maior influência do parâmetro da proporção de MT/MC em comparação com o da temperatura para a ESD durante a brassagem.

Diferentemente, os ensaios 3, 4, 5, 6 e 7, com proporções de 60/40 e 70/30, e temperaturas de 40, 45 e 50 °C, geraram mostos com menores valores de ESD e pouco variados entre si. Esses resultados estão em conformidade com a conclusão de Jin, Zhang, Du (2008) de que, proporções maiores de MT geram mostos com menores valores de ESD devido às maiores quantidades de proteínas nesses

maltes. Além disso, maiores concentrações de proteínas resultam em mais compactação entre os amidos e proteínas presentes nos maltes, reduzindo a hidratação dessas estruturas e a modificação das enzimas durante a mostura.

Para a análise estatística foram selecionados os tempos de 65, 170 e 200 minutos, referentes ao final de mostura e aos 60 minutos e 90 minutos de fervura, respectivamente. O tempo final de mostura foi escolhido por ser o momento em que se atinge a concentração final dos açúcares fermentescíveis, e os tempos de fervura foram escolhidos por serem os momentos de retirada do mosto para a fermentação. Para esses tempos, primeiro se analisa a significância dos parâmetros pelos Gráficos de Pareto (Figura 14).

Figura 14 – Gráficos de Pareto dos parâmetros de brassagem de proporção de MT/MC, temperatura de descanso ácido (°C) e interação entre eles em relação ao ESD (°brix) nos tempos de 65, 170 e 200 minutos da Etapa 01



De acordo com os três gráficos de Pareto (Figura 14), para a resposta ESD, nos tempos de 65, 170 e 200 minutos, percebe-se que os parâmetros de proporção

de MT/MC, temperatura de descanso ácido e interação entre eles, na faixa estudada e em um nível de significância de 95%, não são significativos, já que eles são menores que “ $p = 0,05$ ”. Já a tabela ANOVA (Tabela 9) é usada para avaliar o ajuste e a predição do modelo estatístico, através dos valores do coeficiente de determinação (R^2), do Teste F e do valor de “ p ”.

Tabela 9 – ANOVA dos valores de ESD (°brix) nos tempos de 65, 170 e 200 minutos de brassagem da primeira etapa do estudo

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	R^2	p
65 minutos						
Regressão	2,761	3,000	0,920	2,805	0,728	0,131
Residual	0,983	3,000	0,328			
Total	3,744	6,000				
170 minutos						
Regressão	1,431	3,000	0,477	1,227	0,668	0,379
Residual	1,167	3,000	0,389			
Total	2,598	6,000				
200 minutos						
Regressão	1,941	3,000	0,647	3,405	0,773	0,094
Residual	0,570	3,000	0,190			
Total	2,511	6,000				

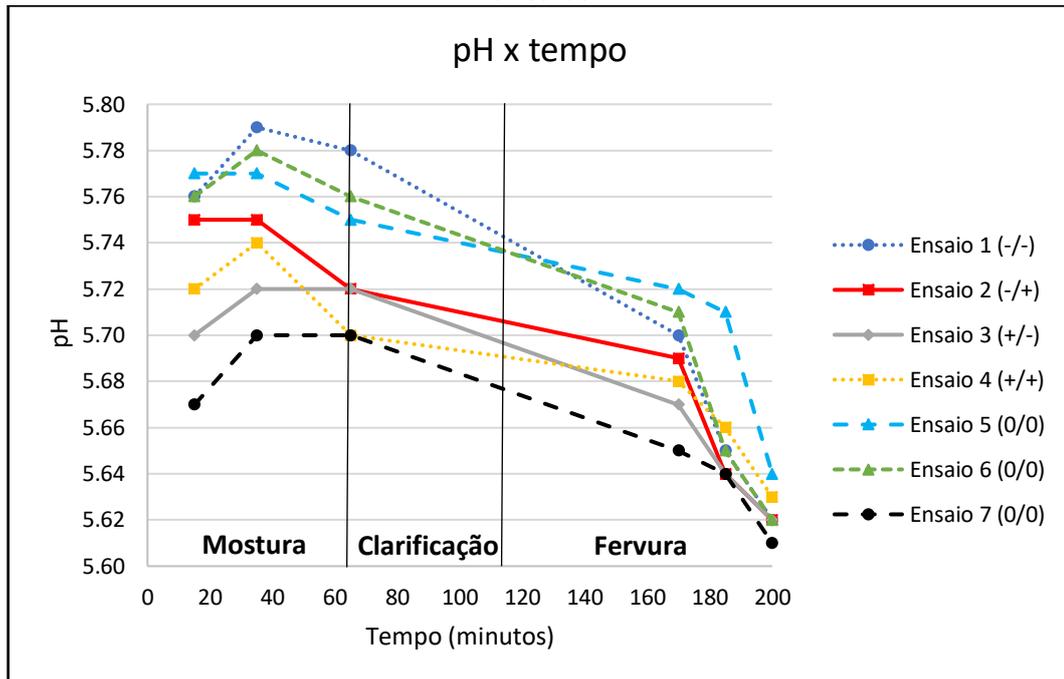
$$F_{\text{tabelado}(0,05;3;3)} = 9,277; F_{\text{calculado}} = \frac{QM_{\text{regressão}}}{GL_{\text{regressão}}}; R^2 = \frac{SQ_{\text{regressão}}}{\text{Total}}; F_{\text{calc.}} (QM_R/QM_r) > F_{\text{tab.}} \text{ no nível de 95\% de confiança } (p < 0,05)$$

Pela Tabela 9, percebe-se que, para os três tempos, os valores experimentais calculados dos testes F são menores que o valor tabelado e que os valores de “ p ” são maiores que 0,05, significando que os modelos não são preditivos. Além disso, nota-se que os valores dos coeficientes de determinação foram baixos ($R^2 < 78\%$), o que define falta de ajuste à regressão dos valores. Possivelmente, esses resultados foram devido à falta de controle da temperatura do equipamento de bancada, que influencia em algumas variáveis importantes do processo, como a taxa de evaporação, a hidratação dos maltes e a atividade enzimática. Sendo assim, é necessário buscar por sistemas alternativos para realizar o processo de brassagem.

4.1.2 pH

Com os valores obtidos do pH para os 7 tempos de amostragem na Tabela C1 (APÊNDICE C), também foram construídos os perfis da de sua evolução ao longo da brassagem (Figura 15). O gráfico dessa figura também está dividido nas três etapas do processo, mostura, clarificação e fervura.

Figura 15 - Perfil cinético do pH do mosto durante o processo da brassagem para os 7 ensaios



(-/-): 50/50 MT/MC; T = 40 °C; (-/+): 50/50 MT/MC; T = 50 °C; (+/-): 70/30 MT/MC; T = 40 °C

(+/+): 70/30 MT/MC; T = 50 °C; (0/0): 60/40 MT/MC; T = 45 °C

Pela Figura 15, nota-se que para todos os ensaios, os valores de pH durante a brassagem se encontram entre 5,80 e 5,60, resultados que estão dentro da faixa de pH ótimo de mostura (5,2 a 5,8), indicado por Palmer (2017). Durante a mostura (até 65 minutos), para os 7 ensaios, houve uma pequena oscilação do pH, tanto para cima como para baixo, o que sugere ser erro de experimental de medição. Nessa etapa, esperava-se haver uma redução mais acentuada devido à reação de íons Ca^{2+} e Mg^{+2} da água com íons fosfato presentes nos maltes (PALMER, 2017). Essa baixa oscilação pode ter sido causada pelo uso de água destilada, que possui menos íons que água potável, normalmente utilizada na produção de cerveja.

A partir da clarificação (entre 65 minutos e 110 minutos), percebe-se uma tendência mais visível de redução de pH. E durante a fervura (entre 110 e 200 minutos), essa redução é ainda mais visível. De acordo com Kunze (2010), em temperaturas mais elevadas, há uma maior desnaturação e coagulação proteica, que reduz o pH do meio. E dessa forma, como a temperatura de fervura é maior que a da clarificação, é natural que haja uma maior redução de pH no final da brassagem.

Estatisticamente, pelos gráficos de Pareto e pela tabela ANOVA, para o pH, os parâmetros de brassagem, nos tempos de 65, 170 e 200 minutos, não foram significativos e não geraram um modelo preditivo. Esses resultados podem ser explicados pelo mesmo problema de inconsistência do controle de temperatura do equipamento, mas também pela variação de medição do pHmetro utilizado. O que sugere que além da melhoria do equipamento de brassagem, há a necessidade de troca do aparelho de medição de pH. Portanto, essa etapa foi considerada preliminar na análise dos parâmetros de brassagem e foi importante para evidenciar a necessidade de um melhor controle dos parâmetros de processo.

4.2 SEGUNDA ETAPA

Diante da falta de ajuste dos dados apresentada pelo equipamento de bancada, viu-se a necessidade de repetição dos 7 ensaios em um equipamento com melhor controle para poder avaliar com mais confiabilidade os parâmetros escolhidos. Porém, nesse caso, foram retiradas apenas as três últimas amostras dos tempos de fervura, para poder não só avaliar e comparar os valores finais de ESD (°brix) e de pH, mas também avaliar a presença dos ácidos fenólicos durante a fervura, que de acordo com Langos *et al.* (2016) é a etapa da brassagem em que a reação de descarboxilação térmica é mais eficiente.

4.2.1 Extrato de sólidos dissolvidos, pH e presença de ácidos fenólicos

Devido ao melhor controle de temperatura, ou seja, da taxa de evaporação do equipamento, nessa segunda etapa, para os ensaios 1 a 6, não houve necessidade de realizar a correção de volume usada na etapa anterior. Porém, durante a etapa de clarificação do Ensaio 7, o tubo central do equipamento (região que comporta os maltes) entupiu, ocasionando em uma perda de água excessiva, o que resultou em um mosto com menor volume e mais concentrado. Sendo assim, para esse ensaio, teve-se que ajustar os dados de ESD como na etapa anterior. Os valores obtidos de ESD e de pH são apresentados na Tabela 10.

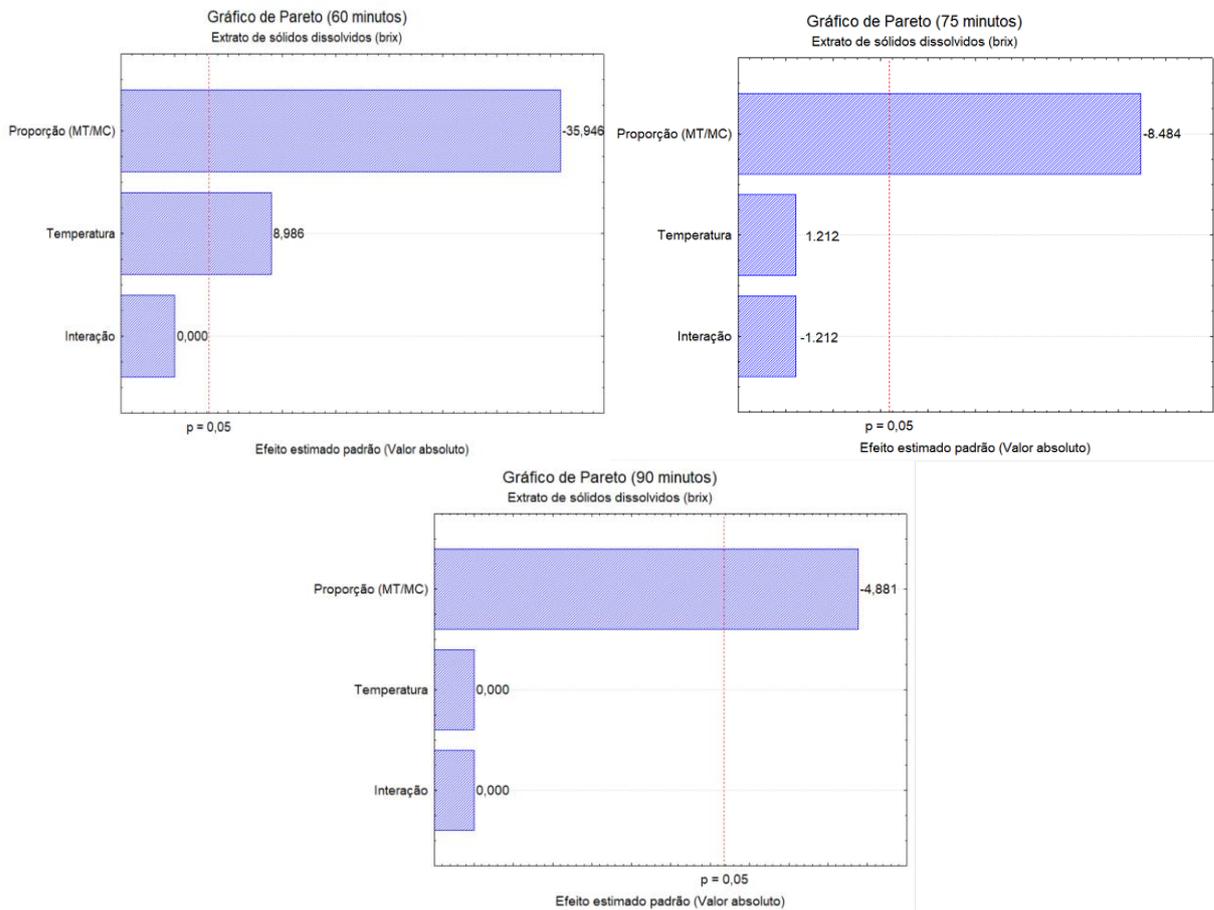
Tabela 10 – Valores de ESD (°brix) e pH das 3 amostras na etapa de fervura nos tempos de 60, 75 e 90 minutos para o planejamento fatorial 2² com 3 pontos centrais

Ensaio	Parâmetros		Respostas					
	P (%MT)	T (°C)	ESD			pH		
			Tempo de retirada de amostras (min)					
			60	75	90	60	75	90
1	- (50)	- (40)	9,81	10,10	10,58	5,47	5,44	5,43
2	- (50)	+ (50)	10,10	10,38	10,58	5,53	5,53	5,51
3	+ (70)	- (40)	8,65	9,23	9,62	5,63	5,61	5,58
4	+ (70)	+ (50)	8,94	9,23	9,62	5,63	5,63	5,62
5	0 (60)	0 (45)	9,42	9,62	9,81	5,61	5,60	5,59
6	0 (60)	0 (45)	9,42	9,52	9,81	5,74	5,66	5,64
7	0 (60)	0 (45)	9,39	9,67	9,92	5,67	5,65	5,64

Através da Tabela 10, de modo similar à etapa anterior, em todos os 7 ensaios, o ESD cresce com o tempo de fervura, explicado pela concentração do mosto por evaporação. Também se percebe que, os Ensaios 1 e 2, com 50/50 em proporção de MT/MC, geraram mostos com maiores ESD, em comparação com os outros 5 ensaios, de 60/40 e 70/40 de MT/MC, mesmo comportamento observado graficamente na Etapa 01. Além da tendência na influência do parâmetro de proporção de maltes, nesse equipamento em específico, isso também pode ser explicado pela redução da eficiência de filtração durante a clarificação ao elevar a quantidade de MT. Esse malte, por não possuir casca, reduz a “filtrabilidade” do malte, impactando na extração dos açúcares durante essa etapa. Novamente, ao comparar os Ensaios 1 e 2 dessa etapa entre si, nota-se que, seus valores de ESD são iguais, sugerindo que a temperatura de descanso ácido, em 40, 45 e 50 °C, não tende a ser significativa para esse fator.

Para a análise estatística desta etapa, foi realizado a ANOVA e a Superfície de Resposta para determinar as melhores condições em relação a proporção de MT/MC e a temperatura de descanso ácido de acordo com o ESD nos três tempos, 60, 75 e 90 minutos (Figura 16).

Figura 16 – Gráficos de Pareto dos parâmetros de brassagem de proporção de MT/MC, temperatura de descanso ácido (°C) e interação entre eles em relação ao ESD (°brix) nos tempos de 60, 75 e 90 minutos da Etapa 02



Pelos Gráficos de Pareto (Figura 16), na faixa estudada e em um nível de significância de 95%, por apresentar um valor de efeito estimado padrão maior que “ $p = 0,05$ ”, percebe-se que o parâmetro de proporção de MT/MC é significativo em relação ao ESD, nos tempos de 60, 75 e 90 minutos, e que o parâmetro de temperatura de descanso ácido é significativo apenas no tempo de 60 minutos. Esse resultado confirma a sugestão da análise gráfica da Figura 13 de que o parâmetro de proporção MT/MC é o mais significativo em relação à sua influência na variação do ESD durante a etapa de brassagem. Porém, para poder analisar se os dados obtidos geram um modelo estatístico ajustado e preditivo, utiliza-se a Tabela ANOVA (Tabela 11).

Tabela 11 – ANOVA dos valores de ESD (°brix) nos tempos de 60, 75 e 90 minutos de fervura da segunda etapa do estudo

	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Teste F	R ²	p
60 minutos						
Regressão	1,415	3,000	0,472			
Residual	0,003	3,000	0,001	472,000	0,998	1,641x10 ⁻⁷
Total	1,418	6,000				
75 minutos						
Regressão	1,061	3,000	0,354			
Residual	0,042	3,000	0,014	25,286	0,962	8,374x10 ⁻⁴
Total	1,103	6,000				
90 minutos						
Regressão	0,925	3,000	0,308			
Residual	0,116	3,000	0,039	7,898	0,888	0,017
Total	1,041	6,000				

$F_{\text{tabelado}(0,05;3;3)} = 9,277$; $F_{\text{calculado}} = \text{QM}_{\text{regressão}}/\text{GL}_{\text{regressão}}$; $R^2 = \text{SQ}_{\text{regressão}}/\text{Total}$; $F_{\text{calc.}} (\text{QM}_R/\text{QM}_r) > F_{\text{tab.}}$ no nível de 95% de confiança ($p < 0,05$).

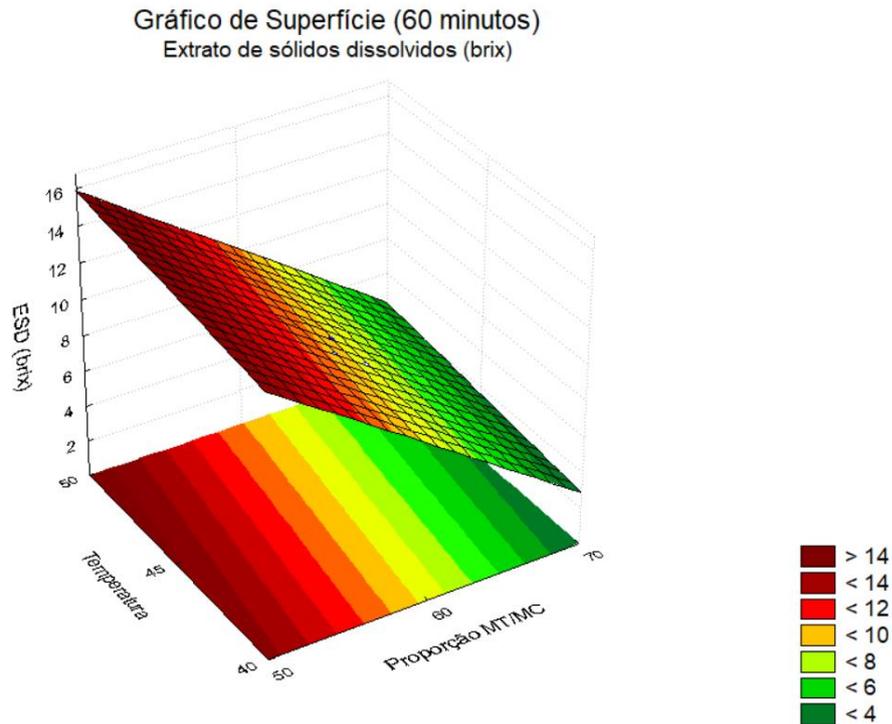
Na Tabela 11, pelos valores dos coeficientes de determinação (R²), nota-se que, nos tempos de 60, 75 e 90 minutos, os modelos estatísticos estão ajustados aos dados de ESD, sendo que, no tempo de 60 minutos, o ajuste é melhor devido ao maior valor de R² = 99,80%. Já pelos valores dos testes F e de “p”, percebe-se que o modelo do tempo de 90 minutos não é preditivo e que os modelos dos tempos de 60 e 75 minutos são preditivos. Sendo assim, o modelo com melhor ajuste e predição em relação ao ESD é o de 60 minutos (Equação 12).

$$\text{ESD}_{60} = 9,392 - 1,154x_1 + 0,288x_2 \quad (12)$$

Sendo x_1 e x_2 os parâmetros independentes da proporção de MT/MC e temperatura de mostura de descanso ácido, respectivamente.

Portanto, com esse modelo estatístico, pode-se construir o Gráfico de Superfície do ESD (°brix) para analisar a melhor condição dos parâmetros variados de proporção de MT/MC e temperatura de descanso ácido (Figura 17).

Figura 17 – Gráficos de Superfície dos parâmetros de proporção MT/MC e temperatura de descanso ácido em relação ao ESD nos tempos de 60, 75 e 90 minutos



Pelo Gráfico de Superfície da Figura 17, o ESD (°brix) tem uma variação mais evidente com a mudança da proporção de MT/MC. Percebe-se que o ESD tende a aumentar quando se reduz a proporção de MT/MC, ou seja, com 50% de malte de trigo. Esse resultado está em conformidade com o que foi percebido graficamente na Figura 13, na análise da Etapa 01. Dessa forma, pode-se concluir que os Ensaios 1 e 2, com 50% de malte de trigo, foram os que apresentaram melhores resultados em relação à eficiência de extração de sólidos dissolvidos (°brix), com $10,58 \pm 0,06$ °brix durante a etapa de brassagem.

Em relação ao pH, na Etapa 02, percebeu-se que seus valores continuaram sem variar significativamente entre os ensaios, com falta de ajuste e modelos sem predição. De qualquer maneira, os valores, para todos os ensaios, ficaram na faixa ótima de processo, entre 5,2 e 5,8 (PALMER, 2017), não impactando sua eficiência. De maneira similar, nesta etapa, a análise qualitativa de cromatografia das amostras dos 7 ensaios gerou indicativos da presença dos ácidos ferúlico e cinâmico. Portanto, esta análise sugere que todas as condições de brassagem estudadas propicia a formação dos precursores do 4VG e do estireno.

4.3 TERCEIRA ETAPA

Na terceira etapa, os mostos dos Ensaios 1 e 2 da segunda etapa, que tiveram os melhores resultados de extração de sólidos dissolvidos (°brix) foram fermentados usando as condições variadas de concentração inicial de levedura e temperatura inicial de fermentação, como indicadas no item 3.3.1. Sendo assim, foram realizadas 4 fermentações distintas por ensaio. Nessa etapa, os parâmetros de ESD, teor alcoólico e pH foram avaliados graficamente ao longo da fermentação. A presença dos ácidos fenólicos, ácido ferúlico e ácido cinâmico, também foi avaliada.

4.3.1 Concentração e viabilidade celular iniciais

Os valores de quantidades de células viáveis necessárias (bilhão), de concentração de células viáveis (cel.g^{-1}) no pacote WB-06 usado e de peso de células de levedura (g) adicionado para as 4 fermentações de cada ensaio foram calculados usando as equações 2 e 3 do item 3.3.2.1 e a metodologia do item 4.4.3 (Tabela 12).

Tabela 12 – Valores de quantidade de células de viáveis de levedura necessárias (bilhão) e peso de células adicionado (g) para as 4 condições de fermentação dos mostos dos dois ensaios de brassagem

Brassagem	Ensaio	Parâmetros		Respostas	
		T (°C)	$C_i(\text{Bil.brix}^{-1} \cdot \text{L}^{-1})$	$Q_{t_{\text{viáveis}}}(\text{bilhão})^a$	Peso de células (g) ^b
1 (-/-)	1	- (18)	- (0,5)	5,290	0,250
	2	- (18)	+ (1,0)	10,580	0,501
	3	+ (24)	- (0,5)	5,290	0,250
	4	+ (24)	+ (1,0)	10,580	0,501
2 (-/+)	5	- (18)	- (0,5)	5,290	0,250
	6	- (18)	+ (1,0)	10,580	0,501
	7	+ (24)	- (0,5)	5,290	0,250
	8	+ (24)	+ (1,0)	10,580	0,501

^a Equação 2 do item 3.3.2.1

^b Equação 3 do item 3.3.2.1

Como ambos os ensaios têm os mesmos valores de volume inicial (1 L) e de ESD (10,58), esses valores se repetiram nos níveis de *Pitching Rate* iguais. Para o cálculo da concentração de células viáveis (cel.g^{-1}) e a viabilidade inicial do pacote WB-06 usado, foi realizada uma duplicata do procedimento do item 3.4.3. Os resultados obtidos foram $2,075 \times 10^{10}$ e $2,150 \times 10^{10} \text{ cel.g}^{-1}$ e 92,22% e 92,47% de

viabilidade, ou seja, uma média de $2,113 \times 10^{10}$ cel.g⁻¹ e 92,35%. Como concentração de células viáveis do pacote usado está acima de 6×10^9 cel.g⁻¹, que é o valor indicado pela Folha Técnica da levedura WB-06 (FERMENTIS, 2017) e a viabilidade celular foi acima de 90%, considerou-se a condição da levedura usada como favorável a um bom desempenho durante a fermentação (WHITE, ZAINASHEFF, 2010).

4.3.2 Extrato de sólidos dissolvidos, teor alcoólico (v/v), pH e presença de AFs

A Tabela 13 apresenta os valores ajustados de ESD, pH e teor alcoólico (v/v) ao longo da fermentação/maturação para as 4 diferentes condições de fermentação dos 2 ensaios de brassagem. Os valores do tempo 0, que são os do mosto final de brassagem, foram corrigidos usando o fator de correção de 1,04, referente ao erro de medição do refratômetro. Já os valores dos outros tempos (24, 48, 72, 96 e 192 horas) foram corrigidos por conta da presença de álcool através do modelo proposto por Terrill (2012). A partir dessas correções, pôde-se calcular o teor alcoólico (v/v) de acordo com o item 3.4.1.

Tabela 13 – Valores de ESD corrigido pelo fator de correção do refratômetro e pela presença de álcool, de teor alcoólico (v/v) e de pH para os 4 ensaios de fermentação dos 2 ensaios de brassagem

Brassagem	Ensaio	Parâmetros		Respostas																	
		T (°C)	C_i (Bil.brix ⁻¹ .L ⁻¹)	ESD corrigido (°brix)						Teor alcoólico (v/v)						pH					
				0	24	48	72	96	192	0	24	48	72	96	192	0	24	48	72	96	192
1 (-/-) 50% MT 40 °C	1	- (18)	- (0,5)	10,58	7,77	5,69	5,20	4,67	4,24	0,00	1,50	2,59	2,84	3,12	3,34	5,46	5,04	4,68	4,42	4,35	4,30
	2	- (18)	+ (1,0)	10,58	7,63	5,49	4,41	3,75	3,42	0,00	1,57	2,69	3,25	3,59	3,76	5,46	4,91	4,66	4,39	4,32	4,27
	3	+ (24)	- (0,5)	10,58	6,95	5,20	4,08	3,83	3,59	0,00	1,93	2,84	3,42	3,55	3,67	5,46	4,76	4,59	4,39	4,32	4,22
	4	+ (24)	+ (1,0)	10,58	6,34	4,75	3,75	3,75	3,59	0,00	2,25	3,07	3,59	3,59	3,67	5,46	4,41	4,26	4,16	4,15	4,14
2 (-/+) 50% MT 50 °C	1	- (18)	- (0,5)	10,58	7,77	5,90	4,67	4,00	3,83	0,00	1,50	2,48	3,12	3,46	3,55	5,61	5,23	4,85	4,67	4,47	4,29
	2	- (18)	+ (1,0)	10,58	6,01	4,75	4,50	4,08	3,59	0,00	2,42	3,07	3,21	3,42	3,67	5,60	4,87	4,64	4,45	4,31	4,18
	3	+ (24)	- (0,5)	10,58	6,01	4,75	4,24	3,75	3,34	0,00	2,42	3,07	3,34	3,59	3,80	5,61	4,79	4,74	4,62	4,47	4,32
	4	+ (24)	+ (1,0)	10,58	5,20	3,83	3,42	3,17	3,08	0,00	2,84	3,55	3,76	3,89	3,93	5,61	4,70	4,49	4,34	4,25	4,17

Esses valores tabelados podem ser analisados de duas formas. A primeira é comparar a influência dos parâmetros de brassagem entre os dois ensaios utilizados (Ensaio 1 e 2) em relação ao ESD, teor alcoólico por volume e pH. Para tanto, construiu-se os perfis da evolução dessas variáveis nas 4 condições de fermentação de forma separada, condição 1 (18 °C, 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹), condição 2 (18 °C, 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹), condição 3 (24 °C e 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹) e condição 4 (24 °C e 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹) (Figuras 18, 19, 20 e 21).

Figura 18 – Evolução do ESD (linhas tracejadas), do teor alcoólico (linhas contínuas) e pH (colunas) durante a fermentação e a maturação dos mostos dos 2 ensaios de brassagem para a 1ª condição de fermentação

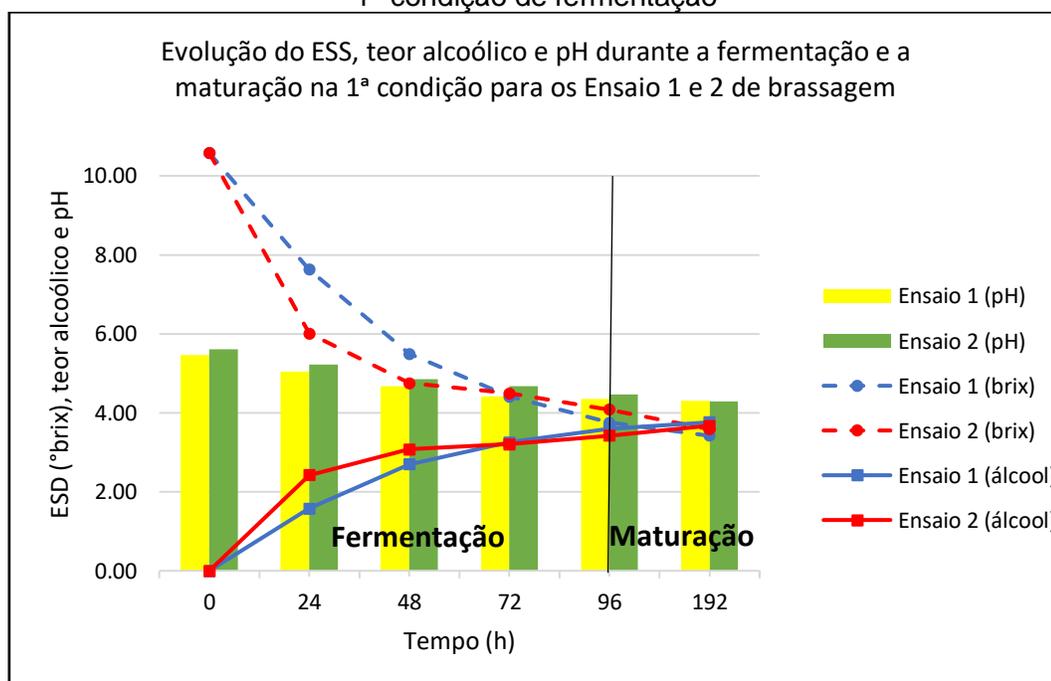


Figura 19 – Evolução do ESD (linhas tracejadas), do teor alcoólico (linhas contínuas) e pH (colunas) durante a fermentação e a maturação dos mostos dos 2 ensaios de brassagem para a 2ª condição de fermentação

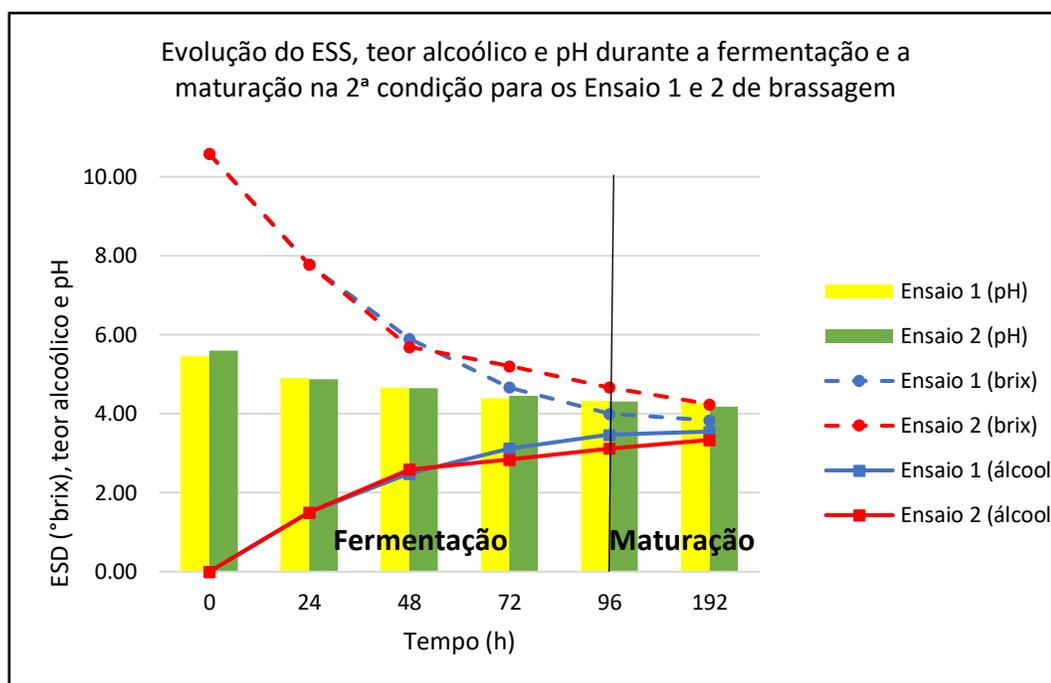


Figura 20 – Evolução do ESD (linhas tracejadas), do teor alcoólico (linhas contínuas) e pH (colunas) durante a fermentação e a maturação dos mostos dos 2 ensaios de brassagem para a 3ª condição de fermentação

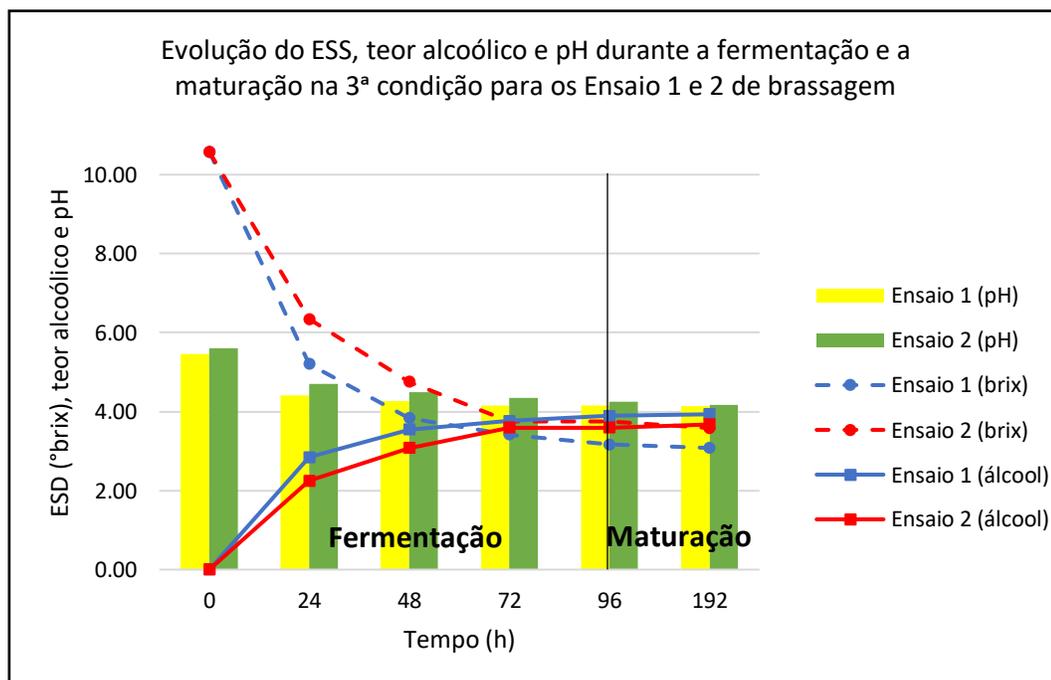
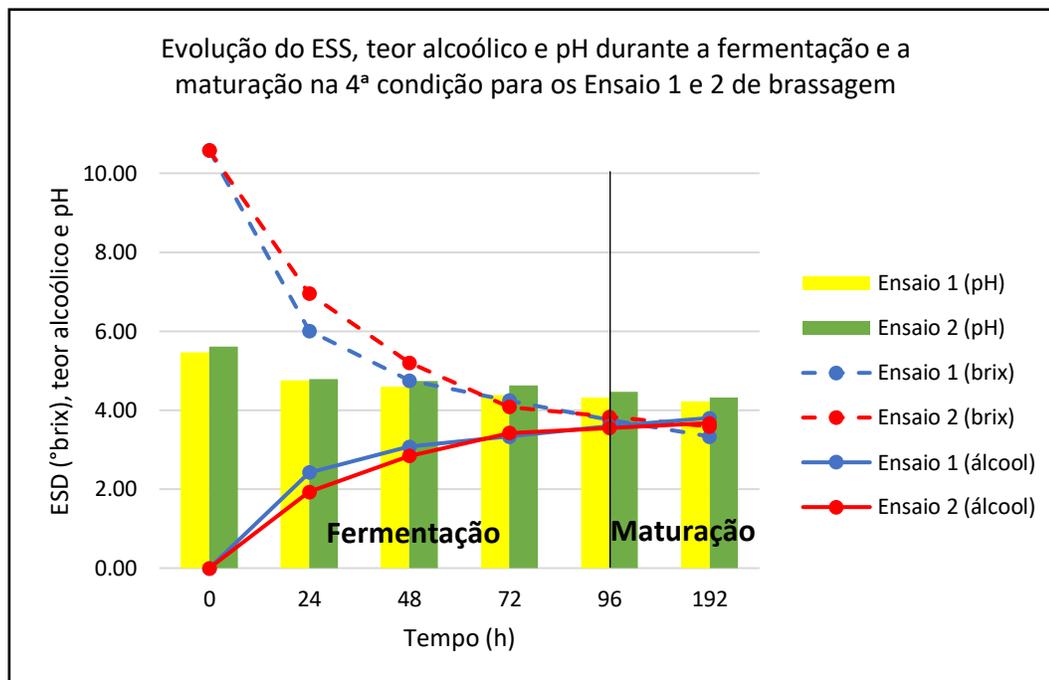


Figura 21 – Evolução do ESD (linhas tracejadas), do teor alcoólico (linhas contínuas) e pH (colunas) durante a fermentação e a maturação dos mostos dos 2 ensaios de brassagem para a 4ª condição de fermentação



Pelas Figuras 18-21, de forma geral, para as 4 condições de fermentação dos 2 ensaios de brassagem, nas 96 primeiras horas, fase conhecida como fermentação primária ou logarítmica, percebe-se uma redução do ESD e um aumento do teor alcoólico mais evidente, e, entre 96 horas e 192 horas, etapa de maturação, nota-se uma estabilidade desses parâmetros. Esse comportamento ocorre possivelmente devido ao aumento da atividade celular da levedura quando há uma maior disponibilidade de açúcar no meio (WHITE, ZAINASHEFF, 2010).

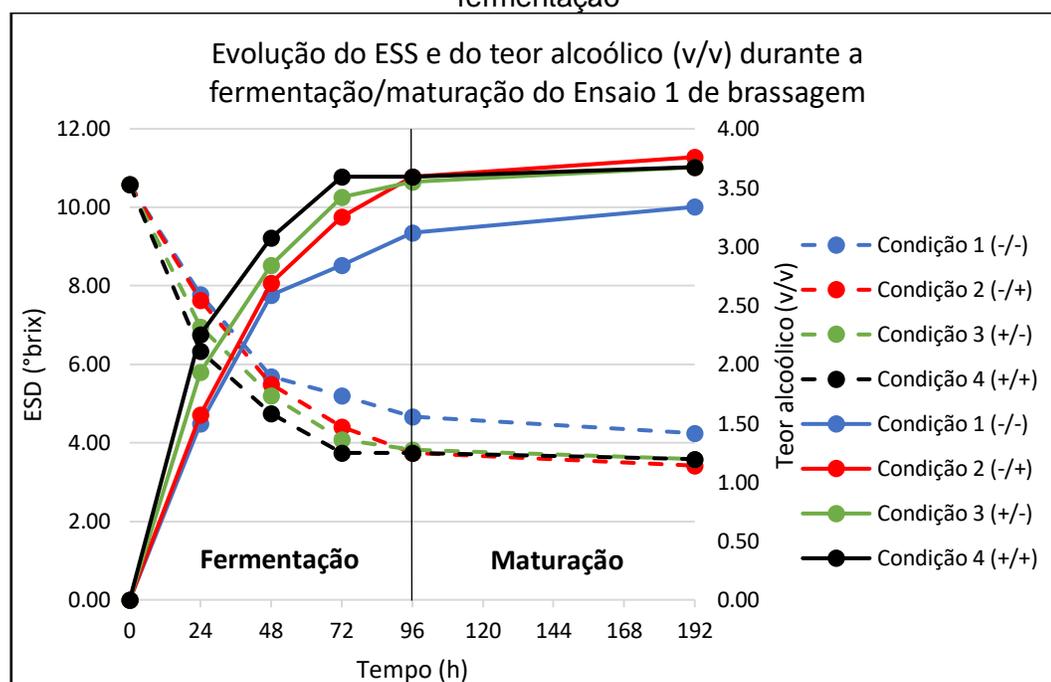
Já, ao comparar os perfis de ESD e de teor alcoólico dos 4 gráficos separadamente, nota-se que, em todas as condições de fermentação, os resultados entre os ensaios 1 e 2 foram bem similares, sugerindo que os parâmetros de brassagem analisados (proporção de malte e temperatura de descanso ácido), nas condições avaliadas, não têm influência sobre a atenuação celular.

Em relação ao pH, para as 4 condições de fermentação dos 2 ensaios de brassagem, percebe-se uma tendência de sua redução ao longo da fermentação primária e estabilidade durante a maturação. Esse comportamento é esperado, pois

durante o metabolismo da levedura ocorre a formação de ácidos orgânicos e liberação de íons H^+ (KUNZE, 2010). Já, ao comparar os 2 ensaios de brassagem, nas 4 condições de fermentação estudadas, verifica-se uma pequena diferença entre os valores de pH obtidos. Em todos os tempos, o Ensaio 2 apresentou valores um pouco maiores que o Ensaio 1. Porém, como essa diferença é muito pequena, pode-se concluir que a variação dos parâmetros de brassagem não impacta no pH de forma a afetar a qualidade da fermentação.

A segunda forma de análise dos valores obtidos na segunda etapa é comparar a influência dos parâmetros de fermentação: temperatura inicial de fermentação (18 e 24 °C) e concentração inicial de fermentação (0,5 e 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹) em relação ao ESD e teor alcoólico (Figuras 22 e 23) para os ensaios 1 e 2, respectivamente.

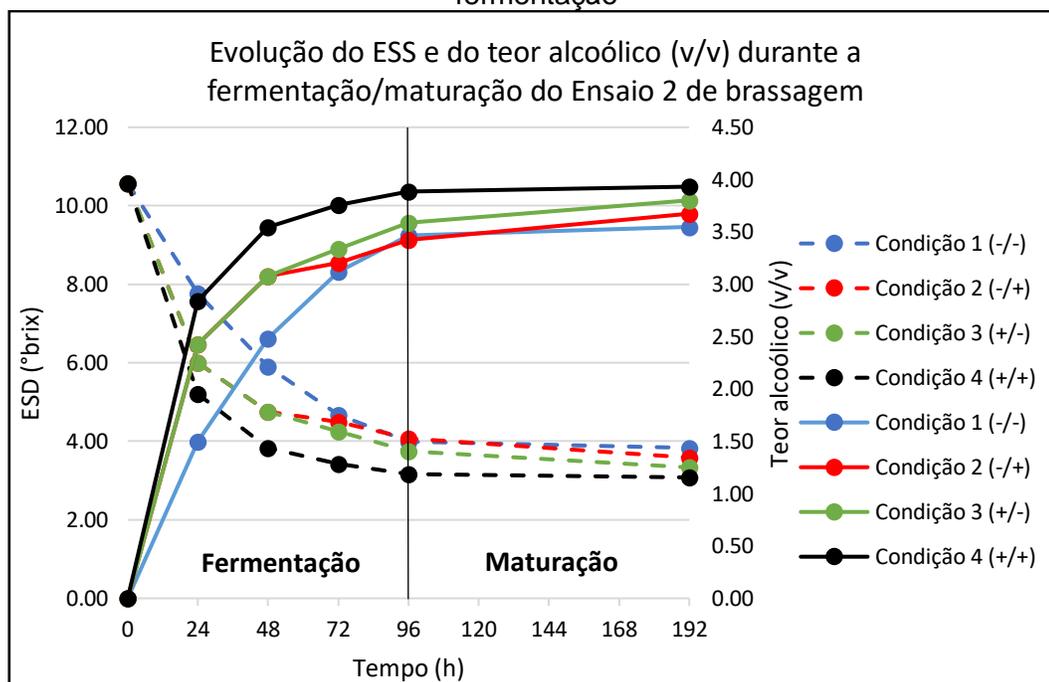
Figura 22 – Evolução do ESD (linhas tracejadas) e do teor alcoólico (linhas contínuas) durante a fermentação e a maturação do mosto do Ensaio 1 da brassagem para as 4 condições de fermentação



(-/-): T = 18 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (-/+): T = 18 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹

(+/-): T = 24 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (+/+): T = 24 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹

Figura 23 – Evolução do ESD (linhas tracejadas) e do teor alcoólico (linhas contínuas) durante a fermentação e a maturação do mosto do Ensaio 2 da brassagem para as 4 condições de fermentação



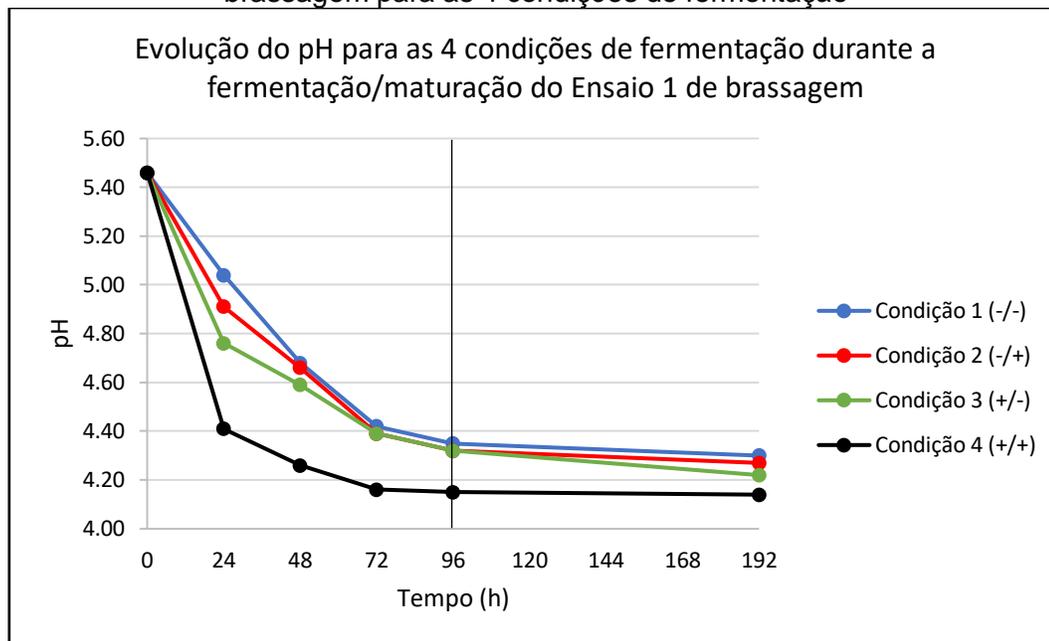
(-/-): T = 18 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (-/+): T = 18 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹
 (+/-): T = 24 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (+/+): T = 24 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹

Diferentemente das Figuras 18-21, as Figuras 22 e 23, apresentam os perfis do ESD e o do teor alcoólico, para as 4 condições diferentes de fermentação dos mostos dos ensaios 1 e 2 de forma separada. Em ambas as figuras, nota-se que a Condição 1 (0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ e 18 °C) foi a que apresentou uma tendência de menor atenuação celular, representada pelo menor valor de teor alcoólico, com 3,34 e 3,55 % para os ensaios 1 e 2 de brassagem, respectivamente, no final do processo (192 horas). Já para as outras condições, os teores alcoólicos finais foram semelhantes, porém com maiores valores, entre 3,93 e 3,67 %, sugerindo que o aumento dos dois parâmetros de fermentação gera uma tendência no aumento da atenuação celular. Resultados que estão de acordo com Palmer (2017) e Verbelen *et al.* (2008) em relação a temperatura e a concentração inicial de levedura, respectivamente. Entretanto, para avaliar de forma mais assertiva a significância desses parâmetros e otimizar a eficiência de fermentação, faz-se necessário realizar um estudo estatístico.

A variação do pH nas 4 condições de fermentação também para os mostos dos 2

ensaios de brassagem também foram avaliados (Figuras 24 e 25, respectivamente).

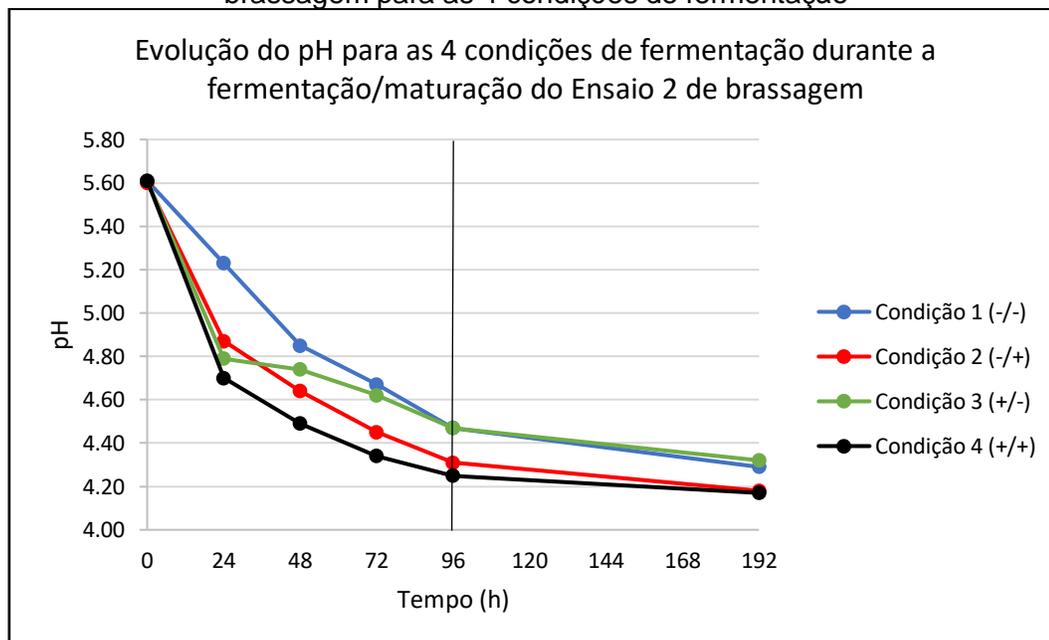
Figura 24 – Evolução do pH durante a fermentação e a maturação do mosto do Ensaio 1 da brassagem para as 4 condições de fermentação



(-/-): T = 18 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (-/+): T = 18 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹

(+/-): T = 24 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (+/+): T = 24 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹

Figura 25 – Evolução do pH durante a fermentação e a maturação do mosto do Ensaio 2 da brassagem para as 4 condições de fermentação



(-/-): T = 18 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (-/+): T = 18 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹

(+/-): T = 24 °C; 0,5 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹ (+/+): T = 24 °C; 1,0 bilhão.brix⁻¹.L⁻¹

Pelas Figuras 24 e 25, vê-se a redução do pH durante a fermentação/maturação. De acordo com Kunze (2010), esse comportamento acontece devido à formação de ácidos orgânicos e à liberação de íons H^+ . Embora os valores finais de todos os ensaios estejam um pouco abaixo dos valores indicados por Kunze (2010) para esta etapa, 4,60 e 4,30, de acordo com Palmer (2017), cervejas de trigo tem valores de pH, geralmente, mais baixos comparados a outras cervejas. Entre os ensaios, graficamente não foi notado nenhuma tendência clara de significância dos parâmetros estudados, sendo necessário de um estudo estatístico mais robusto para ter uma conclusão mais confiável.

Como nas etapas 01 e 02, na fermentação, a análise cromatográfica gerou indicativos de presença dos ácidos ferúlico e cinâmico em todos os tempos de amostragem. Esse resultado, embora seja qualitativo, gera oportunidades para iniciativas científicas no tema a fim de obter resultados mais precisos quanto à formação dos CVAs, 4VG e estireno, importantes para a qualidade sensorial da Cerveja de Trigo e para o fator de segurança do produto.

5 CONCLUSÃO

Na etapa de brassagem, os dois parâmetros analisados (proporção de MT/MC e temperatura de mostura de descanso ácido) foram significativos em relação à eficiência de extração de açúcares definida pelo ESD (°brix), sendo a proporção MT/MC mais significativa. Na faixa estudada, os maiores rendimentos foram obtidos nos Ensaio 1 e 2, com menor proporção de malte de trigo (50%), que apresentaram ESD de $10,58 \pm 0,06$ °brix, em um nível de significância de 95%. Na etapa de fermentação, graficamente, a variação das condições de brassagem dos mostos dos Ensaio 1 e 2 não gerou diferença nos valores finais de ESD, teor alcoólico e pH. Porém, variando-se as condições de fermentação, notou-se graficamente que a eficiência de fermentação tende a aumentar com o aumento da temperatura inicial e da concentração inicial de levedura. Porém, para concluir de maneira mais assertiva, faz-se necessário um estudo analítico dos dados. Pela análise qualitativa de cromatografia das amostras retiradas durante as etapas do processo em todas as condições estudadas, foi notado que há indicativo de presença dos ácidos ferúlico e cinâmico precursores do 4VG e do estireno, respectivamente. Portanto, este estudo, além de indicar a proporção de malte de trigo e de cevada que gera maior rendimento de brassagem, também é importante como base exploratória para que iniciativas científicas mais robustas avaliem e otimizem melhores condições de processo na geração desses CVAs, necessários para se obter uma Cerveja de Trigo dentro dos padrões recomendados.

REFERÊNCIAS

- BALL D. Concentration Scales for Sugar Solutions. **Journal of Chemical Education**, v. 83 (10), p. 1489-1491, 2006.
- CAI S., HAN Z., HUANG Y., CHEN Z-H., ZHANG G. e DAI F. Genetic Diversity of Individual Phenolic Acids in Barley and their Correlation with Barley Malt Quality. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 7051-7057, 2015.
- COGHE S., BENOOT K., DELVAUX F., VANDERHAEGEN B. E DELVAUX F. R. Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: Indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 602-608, 2004.
- COSTA S., CEPPI M., COSTA C., SILVA S., PEREIRA C., LAFFON B., BONASSI S. e TEIXEIRA J. P. The cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay in human populations exposed to styrene: A systematic review and meta-analysis. **Mutation Research**, v. 770, p. 92-105, 2016.
- CUI Y., WANG A., ZHANG Z. e SPEERS A. Enhancing the levels of 4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol in pilot-scale top-fermented wheat beers by response surface methodology. **Institute of Brewing & Distilling**, v. 121, p. 129-136, 2015.
- CUTAIA A., REID A. e SPEERS R. Examination of the Relationships Between Original, Real and Apparent Extracts, and Alcohol in Pilot Plant and Commercially Produced Beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115(4), p. 318-327, 2009.
- DIAS M., FALCONI D. The Evolution of Craft Beer Industry in Brazil. **Journal of Economics and Business**, v. 1, No 4, p. 618-626, 2018.
- DEBYSER W., DERDELINCKX G. E DELCOUR J. A. Arabinoxylan and arabinoxylan hydrolyzing activities in barley malts and worst derived from them. **Journal of Cereal Science**, v. 26, p. 67-74, 1997.
- ECHOLLS, TAYLOR. How Does a Refractometer Work? **sciencing.com**, Disponível em: <<https://sciencing.com/refractometer-work-5314561.html>>. Acesso em: 10 ago. 2020. California, USA, 2017.
- FERMENTIS. Folha de Dados Técnicos – SafAle WB-06. Disponível em: <<https://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2017/10/SafAle-WB-06-PT.pdf>>. Acesso em: 6 maio 2020. Cedex, France, 2017.
- GANGOPADHYAY N., RAI D. K., BRUNTON N. P. GALLAGHER E. e HOSSAIN M. B. Antioxidant-guided isolation and mass spectrometric identification of the major polyphenols in barley (*Hordeum vulgare*) grain. **Food Chemistry**, v. 210, p. 212-220, 2016.
- GRANVOGL M. E LANGOS D. Studies on the simultaneous formation of aroma-active and toxicologically relevant vinyl aromatics from free phenolic acids during wheat beer brewing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2016.
- GU W., LI X., HUANG J., DUAN Y., MENG Z., ZHANG K-Q e YANG J. Cloning, sequencing, and overexpression in *Escherichia coli* of the *Enterobacter sp.* Px6-4 gene

for ferulic acid decarboxylase. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 89, p. 1797-1805, 2011.

HALL M. **Brew by the Numbers Add up What's in your Beer**. Zymurgy Summer 1995.
<

https://www.homebrewersassociation.org/attachments/0000/2497/Math_in_Mash_SummerZym95.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2020.

HERTRICH, D., Topics in Brewing: Brewing Adjuncts. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of Americas**. v. 50(2), p. 72-81, 2013.

JAMAR C., JARDIN P. e FAUCONNIER M-L. Cell wall polysaccharides hydrolysis of malting barley (*Hordeum vulgare* L.): a review. **Biotechnology, Agronomy, Society and Environment**, v. 15(2), p. 301-313, 2011.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **Carcinogenicity of quinoline, styrene, and styrene-7,8-oxide**. Disponível em: <
[http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(18\)30316-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(18)30316-4)>. Acesso em: 12 fev. 2019. Lyon, France, 2018.

KIRIN HOLDINGS COMPANY. **Kirin Beer University Report: Global Beer Consumption by Country in 2019**. Disponível em: <
https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2020/1229_01.pdf > Acesso em: 05 jan. 2021. Tokyo, Japan, 2020.

KIRIN HOLDINGS COMPANY. **Kirin Beer University Report: Global Beer Production by Country in 2018**. Disponível em: <
https://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2019/1003_01.html > Acesso em: 05 jan. 2021. Tokyo, Japan, 2019.

KUCHARCZYK K. e TUSZYNSKI T. The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale. **Journal of the Institute of Brewing**, 123(1), p. 31-38, 2017.

KUNZE, Wolfgang. **Technology Brewing and Malting**. 4. ed. Berlin: VLB, 2010. 960p.

LANGOS D., GRANVOGL M., MEITINGER M. e SCHIEBERLE P. Development of stable isotope dilution assays for the quantitation of free phenolic acids in wheat and barley and malts produced thereof. **European Food Research and Technology**, v. 241, p. 637-645, 2015.

LENTZ, M. The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. **Fermentation**, v. 4, p. 20, 2018.

MADSEN M. G., EDWARDS N. K., PETERSEN M. A., MOKWENA L., SWIEGERS J. H. e ARNEBORG N. Influence of *Oenococcus oeni* and *2 Brettanomyces bruxellensis* on Hydroxycinnamic Acids and Volatile Phenols of Aged Wine. **American Journal of Enology and Viticulture (AJEV)**, 2016, p. 22

MCMURROUGH, I.; MADIGAN, D.; DONNELLY, D.; HURLEY, J.; DOYLE, A. M.; HENNIGAN, G.; MCNULTY, N.; SMYTH, M. R. Control of ferulic acid and 4-vinylguaiacol in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, p. 327-332, 1996.

- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, p. 426, 1959.
- COLEMAN, D. E.; MONTEGOMERY, D. C. **A systematic approach to planning for a designed industrial experiment**. *Technometrics*, v.35, n.1, 1993.
- MOSHER, M., e TRANTHAM, K. **Mashing. Brewing Science: A Multidisciplinary Approach**, 157–182, 2016.
- MUKAI N., MASAKI K., FUJII T., KAWAMUKAI M. e IEFUJI H. PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 564-569, 2010.
- NIAZ K., MABQOOL F., KHAN F., HASSAN F. I., BAEERI M., NAVAEI-NIGJEH M., HASSANI S., GHOLAMI M. e ABDOLLAHI M. Molecular mechanisms of action of styrene toxicity in blood, plasma, and liver. **Environmental Toxicology**, p. 1-11, 2017.
- OCKU G., AYHAN K., GUNES ALTUNTAS E., VURAL N. e POYRAZOGLU E. S. Determination of Phenolic Acid Decarboxylase Produced by Lactic Acid Bacteria Isolated from Shalgam (Şalgam) Juice Using Green Analytical Chemistry Method. **LWT-Food Science and Technology**, 2015.
- PALMER, JOHN. **How to Brew: Everything You Need to Know to Brew Great Beer Every Time**. 4. ed. Boulder, Colorado, p. 582, 2017.
- PAPAZIAN Charlie, GATZA Paul, SWERSEY Chris, SKYPECK Chuck, e RABIN Dan. **Beer Style Guidelines**. Brewers Association (BA). Edição de 2017. 47p. Disponível em: <<http://www.brewerassociation.org>>. Acesso em: 01 fev. 2019.
- SANCHEZ-MALDONADO A. F., SCHIEBER A. e GANZLE M.G. Structure-function relationships of the antibacterial activity of phenolic acids and their metabolism by lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, p. 1176-1184, 2011.
- SCHWARZ K. J., BOITZ L. I. E METHNER F. J. Enzymatic formation of styrene during wheat beer fermentation is dependent on pitching rate and cinnamic acid content. **Institute of Brewing & Distilling**, v. 118, p. 280-284, 2012.
- SCHWARZ K. J., STUBNER R. E METHNER F. J. Formation of styrene dependent on fermentation during wheat beer production. **Food Chemistry**, v. 134, p. 2121-2125, 2012.
- SPEEDING G. e AIKEN T. **Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorizing Waste**, 1. ed., p. 506, 2015.
- STRONG Gordon e ENGLAND Kristen. **Beer Style Guidelines**. Beer Judge Certification Program (BJCP). Edição de 2015. 79p. Disponível em: <www.bjcp.org>. Acesso em: 01 fev. 2019.
- TERRILL S. **Refractometer FG Results**. Disponível em: <<http://seanterrill.com/2011/04/07/refractometer-fg-results/>>. Acesso em: 02 set. 2020. US, 2012.

VANBENEDEN N., GILS F., DELVAUX F. E DELVAUX F. R. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavor compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. **Food Chemistry**, v. 107, p. 221-230, 2008a.

VANBENEDEN N., GILS F., DELVAUX F. E DELVAUX F. R. Variability in the release of free and bound hydroxycinnamic acids from diverse malted barley (*Hordeum vulgare L.*) cultivars during wort production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 11002-11010, 2007.

VANBENEDEN N., ROEY T. V., WILLEMS F., DELVAUX F. E DELVAUX F. R. Release of phenolic flavour precursors during wort production: Influence of process parameters and grist composition on ferulic acid release during brewing. **Food Chemistry**, v. 111, p. 88-91, 2008b.

WANNENMACHER J., GASTL M. e BECKER T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. **Institute of Food Technologists**, v. 0, 2018.

WHITE C. e ZAINASHEFF J. **Yeast: The practical guide to beer fermentation**. Boulder, Colorado, p. 304, 2010.

APÊNDICE A - ESQUEMA DO PROCESSO DE BRASSAGEM COMPLETO

Figura A1 – Esquema do processo de brassagem completo (moagem, mostura, clarificação, fervura e resfriamento) da Braumeister 10L



APÊNDICE B - VOLUMES MEDIDOS E PADRONIZADOS PARA O PLANEJAMENTO FATORIAL

Como a manta térmica possui um sistema manual simples de aquecimento e o béquer é um recipiente aberto, houve inconsistência no controle do volume, gerando medidas de ESD variadas, o que torna a comparação e análise difíceis. Entretanto, uma maneira de corrigir esse erro foi a criação de volumes padronizados para cada tempo de retirada de amostra (Tabela B1) e fazendo cálculos de diluição para prever novos valores de ESD em relação a esses volumes.

Tabela B1 – Volumes medidos e padronizados para o planejamento fatorial 2² com 3 pontos centrais

Ensaio	Parâmetros		Tempo de Retirada de amostras (min)											
			15	35	65	170	185	200	15	35	65	170	185	200
	P (%MT)	T (°C)	Volume medido						Volume padronizado					
1	- (50)	- (40)	430	410	390	420	380	330	430	410	390	410	360	330
2	- (50)	+ (50)	430	420	390	410	370	320	430	410	390	410	360	330
3	+ (70)	- (40)	440	420	390	410	370	320	430	410	390	410	360	330
4	+ (70)	+ (50)	430	420	390	400	360	330	430	410	390	410	360	330
5	0 (60)	0 (45)	430	410	400	410	360	330	430	410	390	410	360	330
6	0 (60)	0 (45)	430	410	390	430	370	340	430	410	390	410	360	330
7	0 (60)	0 (45)	420	400	390	410	390	340	430	410	390	410	360	330

A Tabela B1 apresenta os volumes medidos nos tempos de 15, 35, 65, 170, 185 e 200 minutos para os 7 ensaios de brassagem. Os volumes padronizados escolhidos em sequência de tempo foram 430, 410, 390, 410, 360 e 330, que foram os valores com maior frequência entre os volumes medidos.

Para prever os valores de ESD dos volumes padronizados, usou-se o conceito de extrato total em termos de unidade de gravidade (GU), que é um valor de concentração descrita no livro *Designing Great Beers* de Ray Daniels (2000) e que é obtido pela Equação 13.

$$GU = (SG - 1) \times 1000 \quad (13)$$

Sendo SG, a gravida específica do mosto. Esse valor é obtido ao converter o valor medido de ESD usando a Equação 7 do item 3.4.1. A Tabela B2 apresenta os valores de ESD medidos e os respectivos valores de SG e de GU calculados para todos os tempos de retirada de amostra dos 7 ensaios de brassagem.

Ao multiplicar GU pelo volume do mosto, obtém-se o extrato de sólidos dissolvidos total de determinada solução. Esse valor não é alterado ao diluir, premissa que resulta na Equação 14.

$$Extrato_{T_m} = Extrato_{T_p}$$

$$GU_m \times V_m = GU_p \times V_p \quad (14)$$

Sendo os subscritos “m” e “p” referentes a medido e padronizado, respectivamente. Usando essa equação, pode-se calcular os valores de GU para os volumes padronizados. Em seguida, todos os valores foram convertidos de volta para SG usando a Equação 14 e para ESD usando a Equação 8 do item 3.4.1. A Tabela B3 apresenta os valores de GU corrigidos e os respectivos valores de SG e ESD calculados para todos os tempos de retirada de amostra dos 7 ensaios de brassagem.

Por fim, foi necessário corrigir o erro referente à medição do refratômetro através do fator de correção no valor de 1,04 como indicado no item 4.3.1. A Tabela 8 do item 4 (Resultados) apresenta os valores de ESD de todas as amostras dos 7 ensaios de brassagem após essas correções.

Tabela B2 – Valores de ESD medidos usando o refratômetro, de gravidade específica convertida do valor medido e de unidade de gravidade medida das 6 amostras nos tempos de 15, 35, 65, 170, 185 e 200, para o planejamento fatorial 2² com 3 pontos centrais

Ensaio	Parâmetros		ESD medido (°brix)						Gravidade específica medida (SG)						Unidade de Gravidade medida (GU)					
	P (%MT)	T (°C)	Tempo de retirada de amostra (min)																	
			15	35	65	170	185	200	15	35	65	170	185	200	15	35	65	170	185	200
1	- (50)	- (40)	8,00	13,80	17,40	12,50	14,00	15,50	1,032	1,056	1,072	1,050	1,057	1,063	32	56	72	50	57	63
2	- (50)	+ (50)	8,90	14,70	17,20	12,90	14,70	16,10	1,035	1,060	1,071	1,052	1,060	1,066	35	60	71	52	60	66
3	+ (70)	- (40)	6,30	13,20	16,00	11,50	13,70	15,50	1,025	1,053	1,065	1,046	1,056	1,063	25	53	65	46	56	63
4	+ (70)	+ (50)	6,10	11,80	15,30	12,00	12,90	13,80	1,024	1,048	1,062	1,048	1,052	1,056	24	48	62	48	52	56
5	0 (60)	0 (45)	6,00	12,70	16,80	11,80	13,40	14,50	1,024	1,051	1,069	1,048	1,054	1,059	24	51	69	48	54	59
6	0 (60)	0 (45)	6,10	11,40	16,00	11,90	13,00	14,30	1,024	1,046	1,065	1,048	1,053	1,058	24	46	65	48	53	58
7	0 (60)	0 (45)	6,30	12,20	15,90	11,10	12,80	13,80	1,025	1,047	1,062	1,043	1,050	1,054	25	47	62	43	50	54

Tabela B3 – Valores de unidade de gravidade corrigida, gravidade específica corrigida e de ESD corrigido das 6 amostras nos tempos de 15, 35, 65, 170, 185 e 200, para o planejamento fatorial 2² com 3 pontos centrais

Ensaio	Parâmetros		Unidade de Gravidade corrigida (GU)						Gravidade específica corrigida (SG)						ESD corrigido (°brix)					
	P (%MT)	T (°C)	Tempo de retirada de amostra (min)																	
			15	35	65	170	185	200	15	35	65	170	185	200	15	35	65	170	185	200
1	- (50)	- (40)	32	56	72	52	60	63	1,032	1,056	1,072	1,052	1,060	1,063	7,69	13,27	16,73	12,02	13,46	14,90
2	- (50)	+ (50)	35	61	71	52	61	64	1,035	1,061	1,071	1,052	1,061	1,064	8,90	15,04	17,20	12,90	15,09	15,64
3	+ (70)	- (40)	25	55	65	46	57	61	1,025	1,055	1,065	1,046	1,057	1,061	6,06	12,69	15,38	11,06	13,17	14,90
4	+ (70)	+ (50)	24	49	62	47	52	56	1,024	1,049	1,062	1,047	1,052	1,056	5,87	11,35	14,71	11,54	12,40	13,27
5	0 (60)	0 (45)	24	51	71	48	54	59	1,024	1,051	1,071	1,048	1,054	1,059	5,77	12,21	16,15	11,35	12,88	13,94
6	0 (60)	0 (45)	24	46	65	50	54	60	1,024	1,046	1,065	1,050	1,054	1,060	5,87	10,96	15,38	11,44	12,50	13,75
7	0 (60)	0 (45)	24	46	62	43	54	55	1,024	1,046	1,062	1,043	1,054	1,055	6,06	11,73	15,29	10,67	12,31	13,27

APÊNDICE C - VALORES DE PH

Tabela C1 – Valores de pH das 6 amostras nos tempos de 15, 35, 65, 170, 185 e 200, para o planejamento fatorial 2^2 com 3 pontos centrais.

Ensaio	Parâmetros		pH					
	P (%MT)	T (°C)	Tempo de retirada de amostra (min)					
			15	35	65	170	185	200
1	- (50)	- (40)	5,75	5,75	5,72	5,69	5,64	5,62
2	- (50)	+ (50)	5,76	5,79	5,78	5,70	5,65	5,62
3	+ (70)	- (40)	5,70	5,72	5,72	5,67	5,64	5,62
4	+ (70)	+ (50)	5,72	5,74	5,70	5,68	5,66	5,63
5	0 (60)	0 (45)	5,77	5,77	5,75	5,72	5,71	5,64
6	0 (60)	0 (45)	5,76	5,78	5,76	5,71	5,65	5,62
7	0 (60)	0 (45)	5,67	5,70	5,70	5,65	5,64	5,61