



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA  
DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA

PATRICK GOMES DE SOUZA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO RIZOMA DE  
*Zingiber zerumbet* L. Smith COMO ADJUNTO NA PRODUÇÃO DE  
CERVEJA ARTESANAL**

TESE DE DOUTORADO

MANAUS/AM

2015

PATRICK GOMES DE SOUZA

**ESTUDO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DO RIZOMA DE  
*Zingiber zerumbet* L. Smith COMO ADJUNTO NA PRODUÇÃO DE  
CERVEJA ARTESANAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade  
Federal do Amazonas, como requisito para  
obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.  
Área de Concentração: Biotecnologia de  
Alimentos.

Orientador: Dr. Carlos Cleomir de Souza  
Pinheiro (INPA)

MANAUS/AM

2015

**Estudo do potencial biotecnológico do rizoma de *Zingiber zerumbet* L.  
Smith como adjunto na produção de cerveja artesanal.**

por

PATRICK GOMES DE SOUZA

Essa tese foi apresentada às 09 (nove) horas do dia 14 de agosto de 2015, como requisito para obtenção do título de DOUTOR EM BIOTECNOLOGIA, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho \_\_\_\_\_.

Banca Examinadora:

---

Dra. Helyde Albuquerque Marinho – INPA  
Membro da Banca Examinadora

---

Dra. Miriam Cartonilho Favacho - IFAM  
Membro da Banca Examinadora

---

Dra. Myrian Abecassis Faber – UEA  
Membro da Banca Examinadora

---

Dra. Juliana M.V.M. de Lucena - IFAM  
Membro da Banca Examinadora

---

Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro – INPA  
Orientador e Presidente da Banca Examinadora

MANAUS/AM

2015

## Ficha Catalográfica

S729e Souza, Patrick Gomes de  
Estudo do Potencial Biotecnológico da Utilização do Rizoma de Zingiber zerumbet I. Smith como Adjunto na Produção de Cerveja Artesanal / Patrick Gomes de Souza. 2015  
71 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Carlos Cleomir de Souza Pinheiro  
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Zingiber zerumbet. 2. Adjunto Cervejeiro. 3. Cerveja Artesanal.  
4. Alimento Funcional. I. Pinheiro, Carlos Cleomir de Souza II.  
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedico esse trabalho a minha família, em especial,  
vó **Icléia Souza**, mãe **Márcia Souza**, tias **Ane e Lene Souza**,  
ao meu noivo **Yraquian Alves de Lima** e a minha  
grande amiga **Dra. Márcia Seixas de Castro** pelo incentivo e apoio.

# Sinceros Agradecimentos

A Deus, em primeiro lugar, pela saúde, sabedoria e pelo sonho realizado, por ser minha força e salvação. A intercessão de Maria, Mãe de Jesus pelos momentos mais difíceis que consegui superar até a conclusão desse trabalho.

À minha família, avó, mãe, irmã Priscila Souza e tias Ane Margareth, Mary Lene, Maria do P. Socorro e demais familiares que sempre me incentivaram a estudar e fazer entender que esse é o único bem que nunca será tirado de mim. Agradeço pelas horas incansáveis de apoio desde a escola até o esse último nível.

Ao meu noivo Yraquian Alves de Lima, em especial, pelo incentivo que me deu para que eu pudesse concluir essa última etapa de formação, pelo companheirismo e barreiras que superamos juntos um do outro. Muito obrigado meu amor, seu apoio foi essencial para essa conquista. Eu te amo!

A minha grande amiga Dra. Márcia Seixas de Castro que esteve sempre ao meu lado e juntos nós conquistamos nossos títulos de graduados, mestres e, por fim, doutores em Biotecnologia. A qual eu tenho imenso carinho, orgulho e respeito. Sem tua força e insistência, minha amiga, eu não teria concluído esse trabalho com tanto sucesso. Eu te amo muito minha irmã!

As minhas amigas Mônica Adegas, Dannielle Ribeiro e Daniely Pinheiro, por sempre estarem por perto dando apoio, carinho e amizade desde a nossa graduação. A amizade de vocês é muito importante para mim.

Ao orientador Dr. Carlos Cleomir de Souza Pinheiro pelos ensinamentos, por acreditar no meu trabalho, por compreender minhas ausências nos momentos que tive que dividir entre os estudos, pesquisa e minhas atividades profissionais, pela orientação desse projeto. Fica meu imenso orgulho e admiração pelo seu trabalho.

As minhas amigas Christiane Verçosa, Elaine Farias, Francineude Penha e Iris Célia de Souza pela compreensão dos momentos que precisei estar ausente em função da realização desse trabalho e conclusão dos meus estudos. Tenho muito orgulho de trabalhar com vocês.

Aos meus amigos e técnicos e mestres cervejeiros que contribuíram com minha formação como cervejeiro: Alexandre de Almeida, Luiz Gustavo Valois, Mirela Penaford, Priscilla Fontinelli, Marta Guedes, Danielle Ferreira, Paulo Henrique Zavarize, Willace Nascimento e Aline Furtado.

Aos meus amigos Renan Moraes, Eweni Gomes, Rosenise Dias, Roman Esquivel, Jessica Santos, Natasha Barbosa, Pedro Runas e todos os demais que estão sempre ao meu lado proporcionando momentos de diversão, companheirismo e amizade. Acima de tudo pela amizade e confiança que tenho em cada um de vocês. Sou muito grato pela amizade de vocês.

Aos meus queridos e amados amigos Dra. Miriam Favacho e Dr. Diogo Castro pelo companheirismo ao longo dessa jornada. Nossa vitória é motivo de muita alegria em meu coração.

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela oportunidade e formação.

## RESUMO

SOUZA, Patrick Gomes de. **Estudo do potencial biotecnológico da utilização do rizoma de *Zingiber zerumbet* como adjunto na produção de cerveja artesanal.** 71f. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Universidade Federal do Amazonas: UFAM, 2015.

A produção de cervejas artesanais tem se mostrado em ascensão nos últimos anos no Brasil. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial biotecnológico da utilização do rizoma de *Zingiber zerumbet*, o gengibre amargo, como adjunto na produção de cerveja artesanal. O experimento consistiu na elaboração de uma cerveja artesanal de baixa fermentação, adicionada de rizoma de *Z. zerumbet* na forma de extrato e óleo essencial. A cerveja foi avaliada quanto às variáveis de resposta ao bioprocessamento, análises microbiológicas e caracterização sensorial. Os rizomas apresentaram características que permitem sua utilização como adjunto no processo cervejeiro, como elevado teor de carboidratos de 75,79 g/100g e baixo teor de lipídios de 4,65 g/100g. Com relação à qualidade físico-química da cerveja foram encontrados os seguintes atributos: cor de 10,03 EBC, amargor de 39,20 BU, gás carbônico (CO<sub>2</sub>) de 0,38 % p/p, pH de 4,63, turvação de 2,67, dicetonas de 0,31 mg.L<sup>-1</sup>, teor alcoólico foi de 4,96 % v/v e 0,53 mUA de zerumbona que comprova que o composto foi preservado até o envase do produto acabado, além de aumentar em cerca de 2,4 BU o amargor da bebida. Quanto às variáveis de resposta do bioprocessamento apresentou rendimento de células (Y<sub>X/S</sub>) de 0,322 g.g<sup>-1</sup> e eficiência fermentativa (EF) de 88,45 %. Os resultados microbiológicos mostraram que o processo de pasteurização eliminou todos os microrganismos que surgiram ao longo do processo. A cerveja apresentou aroma aparente característico do gengibre amargo, leve adstringência, amargor moderado com remanescência no final da língua, cor amarelo claro, espuma baixa e leve turvação característica de cerveja artesanal. Os resultados permitiram concluir que o gengibre amargo proporcionou aumento de amargor da cerveja e possivelmente pode apresentar propriedades nutracêuticas ou farmacológicas.

**Palavras-chave:** *Zingiber zerumbet* – Adjunto Cervejeiro – Cerveja Artesanal.

## ABSTRACT

SOUZA, Patrick Gomes. . **Study of the biotechnological potential from utilization of the *Zingiber zerumbet*'s rhizome as adjunct on craft beer production. 71p.** Thesis (Doctorate in Biotechnology). Federal University of Amazonas: UFAM, 2015.

The production of craft beer has become something in constant growth in the recent years in Brazil. This study bring as objective to evaluate the biotechnological potential from the utilization of the *Zingiber zerumbet*'s rhizome, The bitter ginger, as adjunct in craft beer production. The experiment consisted on elaboration of a craft beer of low fermentation, adding *Z. zerumbet* rhizome extract and essential oil. The beer was rated into several criteria, including bioprocess response , microbiological analysis and sensorial characterization. The rhizomes show characteristics that allow his utilization as adjunct in the beer production process, With a high rate of carbohydrates of 75,79 g/100g and low lipids rate from 4,65 g/100g. In relation at the physical and chemical qualities it was found the following attributes: color of 10,03 EBC, bitter of 39,20 BU, carbonic gas (CO<sub>2</sub>) of 0,38 % p/p, pH of 4,63, turbidity of 2,67, diketones of 0,31 mg.L<sup>-1</sup>, alcoholic content was 4,96% v/v and 0,53 mUA from zerumbona what proves that the compound was preserved until the bottle phase of the final good, in additional it has increased the bitter of the beverage in about 2,4 BU. In relation at response variations of the bioprocess it showed yield of cells ( $Y_{XS}$ ) de 0,322 g.g<sup>-1</sup> and fermenting efficiency (EF) of 88,45%.The microbiological results has showed that the pasteurization process has eliminated all the microorganisms that appeared on the process. The beer presents scents from the ginger. Mild astringency, moderate bitter and it remains lightly at tongue in the end. color dark yellow, low level of foam , and light turbidity as common characteristic from craft beer. The results allow to conclude that the bitter ginger has provided increase of the bitter , and probably can present nutraceuticals and pharmacological characteristics.

**Keywords:** *Zingiber zerumbet* – Adjunctal Beer Process – Craft Beer.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO / JUSTIFICATIVA</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
2.1. Geral	5
2.2. Específicos	5
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>6</b>
3.1. Alimentos Funcionais	7
3.2. Gengibre Amargo ( <i>Zingiber zerumbet</i> )	7
3.3. Cerveja	9
3.3.1. História	9
3.3.2. Legislação	13
3.4. Matérias-Primas Cervejeiras	15
3.4.1. Água Cervejeira	15
3.4.2. Cevada e Malte de Cevada	16
3.4.3. Lúpulo	18
3.4.4. Levedura Cervejeira	20
3.4.5. Adjuntos do Processo Cervejeiro	21
3.5. Cerveja Artesanal e o Mercado Cervejeiro	22
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
4.1. Material	24
4.2. Delineamento Experimental	25

4.3. Processamento do Rizoma de Gengibre Amargo	27
4.3.1. Extração do Óleo Essencial por Hidrodestilação	27
4.3.2. Cálculo do Rendimento do Óleo Essencial	28
4.3.3. Análises Fitoquímicas do Óleo Essencial e da Cerveja Artesanal	28
4.3.4. Análises Físico-Químicas do Rizoma	29
4.3.5. Análises Químicas de Minerais do Rizoma	32
4.4. Análises do Malte de Cevada	32
4.5. Elaboração do Mosto Cervejeiro	33
4.5.1. Moagem do Malte de Cevada	33
4.5.2. Mosturação e Filtração	33
4.5.3. Cozimento e Resfriamento do Mosto	34
4.6. Fermentação da Cerveja	34
4.6.1. Inoculação do Fermento e Fermentação	34
4.6.2. Monitoramento dos Processos Fermentativos	35
4.6.3. Contagem de Células Vivas	35
4.7. Maturação, Filtração e Obtenção da Cerveja	36
4.7.1. Maturação e Filtração	36
4.7.2. Envase	36
4.8. Caracterização Físico-química, Microbiológica e Sensorial da Cerveja	36
4.8.1. Caracterização Físico-química	36
4.8.2. Variáveis de Resposta do Bioprocesso	38
4.8.3. Avaliação Microbiológica	40
4.8.4. Análise Sensorial	41

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>42</b>
5.1. Caracterização do <i>Zingiber zerumbet</i> e derivados	43
5.1.1. Aspectos Morfológicos do Rizoma do Gengibre Amargo	43
5.1.2. Composição Físico-química do <i>Zingiber zerumbet</i>	43
5.1.3. Composição de Minerais do <i>Zingiber zerumbet</i>	45
5.1.4. Rendimento do Rizoma	46
5.1.5. Triagem Fitoquímica	46
5.1.6. Cromatografia Gasosa do Óleo Essencial	48
5.2. Avaliação Qualitativa dos Grãos de Malte	49
5.3. Elaboração do Mosto Cervejeiro	50
5.4. Fermentação e Maturação da Cerveja	52
5.5. Contagem de Células Vivas	54
5.6. Caracterização das Cervejas	54
5.7. Variáveis de Resposta do Bioprocesso	57
5.8. Avaliação Microbiológica	58
5.9. Descritivo Sensorial	59
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
<b>7. REFERÊNCIAS</b>	<b>63</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1.** Plantação de *Zingiber zerumbet*. Foto: Carlos Cleomir. 8
- Figura 2.** Principais componentes químicos de *Zingiber zerumbet* de origem europeia. Fonte: PINHEIRO (2005). 8
- Figura 3.** Monumento Blau (4.000 a.C.), possui uma imagem representativa de uma cerveja sendo oferecida à deusa Nin-Harra. 11
- Figura 4.** Rótulos das primeiras cervejas brasileiras: Bohemia, Antarctica e Brahma. Fonte: Ericksilveira.blogspot.com.br. 12
- Figura 5.** Esquema morfológico de um grão de malte em corte longitudinal. Fonte: Google Images. 16
- Figura 6.** Grãos de malte de cevada maltados. Foto: Patrick Souza. 17
- Figura 7.** Estrutura básica dos ácidos do lúpulo: alfa-ácidos e beta-ácidos. Fonte: Kunze (2009). 19
- Figura 8.** Pelletes de lúpulo. Fonte: Hominilupulo.com.br. 20
- Figura 9.** Delineamento experimental com as etapas resumidas do processo de produção da cerveja artesanal com gengibre amargo. 26
- Figura 10.** Em (A) processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Em (B) o óleo essencial extraído do rizoma. Fotos: Patrick Souza. 27
- Figura 11.** Tubérculo do gengibre *amargo Zingiber zerumbet* (A) e tubérculos em corte transversal (B). Foto: Patrick Souza. 43
- Figura 12.** Cromatografia gasosa do rizoma de *Zingiber zerumbet* com marcação do composto zerumbona em evidência. 49

- Figura 13.** Aspecto morfológico do malte Agromalte. 50
- Figura 14.** Aspecto visual do início da mostura. Foto: Patrick Souza 51
- Figura 15.** Bagaço retido após a etapa de filtração do mosto. Foto: Patrick Souza. 51
- Figura 16.** Trub em processo de formação após a fervura. Foto: Patrick Souza. 52

## Lista de Gráficos

- Gráfico 1.** Curva de mostura com rampas de temperatura em função do 50  
tempos.
- Gráfico 2.** Rampa de temperatura de fermentação e maturação da 53  
cerveja.
- Gráfico 3.** Variáveis do processo relacionadas à temperatura, extrato 54  
aparente e teor alcoólico em função do tempo.

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Composição físico-química do <i>Zingiber zerumbet</i> .	44
<b>Tabela 2.</b> Composição de minerais do gengibre amargo.	45
<b>Tabela 3.</b> Prospecção fitoquímica dos extratos de <i>Zingiber zerumbet</i> .	47
<b>Tabela 4.</b> Avaliação dos maltes de cevada.	49
<b>Tabela 5.</b> Composição físico-química da cerveja artesanal com gengibre amargo.	55
<b>Tabela 6.</b> Variáveis de resposta dos bioprocessos de elaboração da cerveja.	57
<b>Tabela 7.</b> Avaliação microbiológica antes do processo de pasteurização da cerveja artesanal com gengibre amargo.	58
<b>Tabela 8.</b> Avaliação microbiológica após o processo de pasteurização da cerveja artesanal com gengibre amargo.	58

# 1. Introdução/Justificativa

## 1. INTRODUÇÃO/JUSTIFICATIVA

A produção de cervejas artesanais tem se mostrado em ascensão nos últimos anos no Brasil. Essas cervejas possuem características que as distinguem das cervejas industrializadas. As cervejas artesanais possuem sabor e aroma mais pronunciados que são percebidas com mais facilidade pelo consumidor no momento da sua apreciação. Por esse motivo atraem consumidores mais exigentes em termos de qualidade sensorial.

O consumo de cervejas artesanais tem se popularizado de maneira interessante, chegando a impactar na participação de mercado das marcas industrializadas mais comuns no mercado. Devido a essa mudança de comportamento de uma parte significativa dos consumidores, as grandes cervejarias tiveram que adotar medidas para aumentar sua venda. Nos últimos anos grupos como a Ambev e Brasil Kirin adquiriram microcervejarias e todos seus maquinários e começaram a produzir cervejas artesanais.

As características, provenientes dentre outros fatores, da utilização de variedades específicas de lúpulo, malte e outras matérias-primas, justificam o crescimento acentuado deste segmento (KEUKELEIRE, 2000). Diversas universidades e institutos de pesquisa têm iniciado estudos com a utilização de novos adjuntos, como cerveja de banana (CARVALHO et al., 2007), cerveja de arroz preto (ANDRADE, 2007) e cerveja com adjunto de pupunha (SOUZA, 2010), entre outros. A incorporação de extrato vegetal e especiarias que substituam uma parte do lúpulo (*Humulus lupulus*,L) por outra fonte complementar de amargor para cerveja é uma linha de pesquisa com poucos estudos relacionados.

O lúpulo é um ingrediente importado de países frios, o que torna o produto mais valorizado no mercado. Encontrar uma matéria-prima que forneça à cerveja características semelhantes constitui-se uma alternativa promissora para os produtores de cerveja artesanal. A utilização de gengibre amargor despertou o interesse do presente estudo.

O *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, popularmente conhecido como gengibre amargo, é uma planta asiática que foi introduzida na região amazônica. Na Ásia é utilizada na medicina popular para o tratamento de inúmeras doenças, associada a efeitos hepatoprotetor, antitumórfico, citotóxico, antibacteriano

(NAG et al., 2013). Além dessas características o gengibre apresenta sabor amargo que pode torná-lo um vegetal substituto do lúpulo.

A literatura mostra que alguns componentes isolados, como a zerumbona e a humulona apresentam atividades antivirais, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antialérgica e antimicrobianas (BUCKER et al., 2013). O que poderia tornar a cerveja ainda mais atrativa, com característica de amargor e possíveis traços farmacológicos e nutracêuticos.

O presente trabalho tem como interesse o estudo do potencial biotecnológico do rizoma de *Zingiber zerumbet* L. Smith como adjunto na produção de cerveja artesanal, que será uma opção para utilização dessa matéria-prima que além de possuir atributos farmacológicos, está sendo produzida no interior do Estado do Amazonas para atender futuras necessidades de mercado.

## 2. Objetivos

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Avaliar o potencial biotecnológico do rizoma de *Zingiber zerumbet* como adjunto na produção de cerveja artesanal.

### **2.2. Específicos**

2.2.1. Caracterizar a composição química do rizoma de gengibre amargo.

2.2.2. Elaborar cerveja artesanal por meio de processo fermentativo em batelada com leveduras livres.

2.2.3. Realizar análise fitoquímica do óleo essencial do gengibre e da cerveja artesanal obtida.

2.2.4. Monitorar o processo fermentativo por meio de análises físico-químicas.

2.2.5. Avaliar as características físico-químicas, microbiológica e sensorial da cerveja artesanal, determinando o potencial do rizoma para essa finalidade.

### 3. Referencial Teórico

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1. Alimentos Funcionais**

A saúde e a qualidade de vida constituem, hoje, uma das preocupações mais relevantes de alguns segmentos de consumidores. Esta preocupação está associada basicamente a três fatores: alimentação incorreta, sedentarismo e estresse, que originam problemas de saúde como a obesidade. O avanço do conhecimento no campo da saúde e a velocidade da difusão do conhecimento permitiram uma maior preocupação com a saúde e a qualidade de vida (OLIVEIRA; CARDOSO, 2010).

Diversos fatores estimulam o desenvolvimento de alimentos funcionais ao longo dos últimos anos, dentre os quais se destacam: o aumento da expectativa de vida em países desenvolvidos, o elevado custo dos serviços de saúde, os avanços na tecnologia de alimentos e ingredientes, a necessidade que as instituições públicas de pesquisa têm de divulgar os resultados de suas investigações e a maior cobertura dada pelos diferentes tipos de mídia a essas descobertas e às questões de saúde (CASEMIRO; RAMOS, 2014).

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e à saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002; COLLA; MORAES, 2006). O gengibre amargo é um vegetal que apresenta propriedades farmacológicas que vem sendo estudadas ao longo de vários anos (NAG et al., 2013).

#### **3.2. Gengibre Amargo (*Zingiber zerumbet*)**

O *Zingiber zerumbet* L. Smith (Figura 1) é uma planta asiática introduzida na região Amazônica, que tem sido muito utilizada na medicina popular asiática para tratar uma série de doenças (BUCKER et al., 2013). No Estado do Amazonas essa planta está sendo cultivada na área rural do município de Manaus, conhecida como Pau-Rosa.

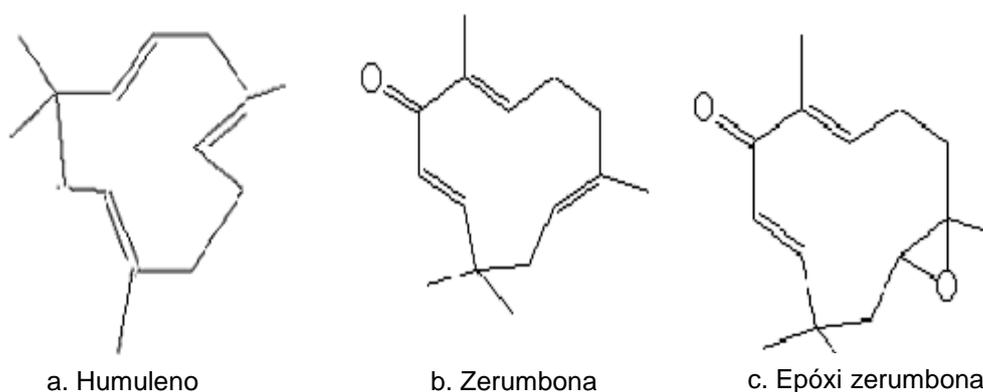
Agricultores dessa região estão ampliando a produção para atender à demanda de empresas localizadas na cidade de Manaus, como a Biozer. Essa empresa dedica-se a produção de cosméticos e fármacos produzidos a partir do gengibre amargo.



**Figura 1.** Plantação de *Zingiber zerumbet*, na área rural do município de Manaus, conhecida como Pau-Rosa, Manaus/AM.

Foto: Carlos Cleomir.

Extratos dos rizomas de gengibre amargo têm aplicações farmacológicas com propriedades: antiinflamatórias, quimiopreventivas, quimioterápicas (MURAKAMI et al, 1999; HUANG et al., 2005), além de atuarem como agentes anti HIV, antitumoríferos, citotóxico e antibacteriano (MATTHES et al, 1980; DAÍ et al, 1997; FUJIMOTO et al, 1998). Alguns compostos isolados a partir do óleo essencial, tais como zerumbona, humuleno e epóxi-zerumbona (Figura 2), possuem propriedades anti-inflamatória, antiviral, antitumoral, antioxidante e atividade antimicrobiana (ABDUL et al, 2008; YOB et al., 2011).



**Figura 2.** Principais componentes químicos de *Zingiber zerumbet*.

Fonte: PINHEIRO (2005).

Estudo químico-farmacológico do extrato pentânico dos rizomas de *Zingiber zerumbet* cultivados na Índia, revelou a presença dos compostos humuleno, zerumbona, epóxi-zerumbona, diferuolmetano, kaempferol e di-*p*-coumaroilmetano. Estes compostos apresentaram atividades citotóxicas “*in vitro*” em cepas de células neoplásicas de fígado de rato (DAÍ et al, 1997).

A espécie *Zingiber zerumbet* contém zerumbona, um componente citotóxico usado na China para o tratamento do câncer. A erva é usada medicinalmente, para enjôo, náusea, indigestão, cólicas, resfriados, tosses, gripes e problemas circulatórios periféricos (HUANG et al., 2005).

Na medicina chinesa, os rizomas de *Zingiber zerumbet* são utilizados para tratamentos de tosses, resfriados, diarreia, vômitos e dor abdominal associada ao resfriado (rizoma fresco), hemorragia uterina e sangue na urina (rizoma fresco carbonizado); inchaço do abdômen e edema (casca do rizoma) e perturbações digestivas e bronquite crônica (rizoma seco). Os rizomas novos e frescos (gingibre verde) são usados nas culinárias e consumidos crus, preservados em xarope, e doces, também usados em molhos picantes, pepinos em conserva, pratos de carnes, peixes, sopas (PINHEIRO, 2005).

A utilização de derivados do gengibre amargo, como óleo essencial e extrato, consiste em uma excelente alternativa para utilização dessa matéria-prima, além de poder conferir aos produtos propriedades farmacológicas. Os óleos essenciais obtidos das porções da planta têm potencial para utilização na indústria alimentícia e farmacêutica, por apresentarem componentes naturais que podem ser utilizados na preservação de alimentos e por combater doenças de origem microbiana (CIOLFI, 2010).

### **3.3. Cerveja**

#### **3.3.1. História**

No Brasil, a cerveja possui grande participação no mercado de bebidas alcoólicas, e o consumo de cerveja artesanal, em especial, vem crescendo ano a ano com o objetivo de testar novas matérias-primas e inovações de processo. Ao longo dos anos a cerveja passou por uma série de modificações, entre elas a adição do lúpulo e a filtração da bebida, o que proporcionou seu sucesso (SENAI, 1997).

A origem da cerveja é desconhecida. Não se sabe ao certo quando ou onde surgiram as primeiras cervejas. No entanto, acredita-se que sua origem se deu na região da Mesopotâmia por volta de 6.000 anos a.C. Estudos têm mostrado que a produção de cerveja surgiu paralelamente ao cultivo de cereais, como a cevada, o trigo e o centeio (KUNZE, 2009).

Documentos históricos mostram que os sumérios produziam uma bebida fermentada, obtida de cereais, que os deixava eufóricos. Possivelmente, a primeira cerveja surgiu a partir do momento em que a cevada, que era mantida armazenada para consumo, entrou em contato com água e, após alguns dias, deu origem a cerveja. Há evidências do consumo de cerveja por civilizações como sumérios, babilônios e egípcios, onde o consumo da bebida alcançava toda a sociedade (DRAGONE; ALMEIDA E SILVA, 2010).

Na Suméria, cerca de 40% da produção dos cereais era destinada às cervejarias chamadas “casa de cerveja”, mantidas por mulheres (HAMPSON, 2014). A produção da cerveja pelos sumérios, a exemplo dos egípcios, era muito rudimentar.

No Egito, o processo cervejeiro passou a ser exercido por padeiros devido à natureza da matéria-prima, como grãos de cereais e leveduras (AMBEV, 2011). A cevada era deixada de molho até germinar e então moída grosseiramente, moldada em bolos aos quais adicionava-se uma pequena quantidade de água. Os bolos, após parcialmente assados e desfeitos, eram colocados em jarra com água e deixados fermentar. Os egípcios escreveram as primeiras receitas de fabricação das cervejas (OLIVEIRA, 2011).

A cerveja também teve grande importância nas civilizações assíria e babilônica, sendo que os assírios tinham legislação a respeito, no código *Hamurabi* (primeira legislação da humanidade) regulamentando a fabricação e comercialização do produto. O registro mais antigo da humanidade, conhecido como Monumento Blau (4.000 a.C.), possui uma imagem representativa de uma cerveja sendo oferecida à deusa Nin-Harra (Figura 3).



**Figura 3.** Monumento Blau (4.000 a.C.), possui uma imagem representativa de uma cerveja sendo oferecida à deusa Nin-Harra.

Fonte: Heliotricity.com.

A bebida evoluiu durante o período grego e romano, apesar de ter tido menor importância quando comparada com o vinho. Ao contrário do vinho, considerado a bebida dos deuses e consumido pelas classes sociais mais abastadas, a cerveja era consumida pelas classes sociais menos favorecidas, sendo muito apreciada em regiões dominadas pelo império romano, principalmente germano e gaulês. Por esse motivo os romanos as consideravam desprezíveis e típicas de povos bárbaros (MORADO, 2009).

Os romanos associavam a cerveja à deusa Ceres, deusa da agricultura e da fertilidade. A partir daí surgiu a palavra “cerveja” originada da palavra latina *cervisia* ou *cerevisia*. A palavra “cereal” também surgiu a partir do nome da deusa Ceres (HAMPSON, 2014).

A cerveja era produzida utilizando-se uma pequena porção de ervas com objetivo de mantê-la mais suave no sabor e aromatizada. Nesse momento, várias espécies vegetais foram adicionadas à cerveja, entre elas a lavanda, coentro, alecrim e cominho. Somente na idade média, o lúpulo, considerado, atualmente matéria-prima essencial para a produção da cerveja foi acrescentado à cerveja e a bebida passou a ser produzida em escalas maiores, principalmente nos mosteiros (MORADO, 2009).

A Lei Alemã “Reinheitsgebot”, aprovada em 1516 pelo Duque Guilherme IV, aprovou o que é conhecido hoje, como a lei mais antiga do mundo sobre a manipulação de alimentos: a cerveja deve ser produzida somente com cevada, lúpulo e água, sendo que, somente o lúpulo poderia ser utilizado para conferir o sabor amargo da cerveja produzida no país. Atualmente o lúpulo é considerado, em nível mundial, como uma matéria-prima essencial para a produção de cerveja (DRAGONE et al., 2007).

Em Portugal, há notícias da existência de uma fábrica de cerveja em Lisboa de 1689, contudo, nessa época, a produção de cerveja competia com a produção de vinhos, muito mais popular entre os portugueses. A partir dos portugueses a cerveja chegou ao Brasil. Os primeiros documentos que fazem referência da bebida no País datam do século XVII. No entanto, o hábito de consumir cerveja foi trazido por D. João VI, no século XIX, durante a permanência da família real portuguesa no Brasil. Nessa época, a bebida consumida era importada de países europeus, sobretudo da Inglaterra (HAMPSON, 2014).

O primeiro registro da produção nacional de cerveja data do ano de 1836, no Rio de Janeiro, da Cervejaria Bohemia, com a marca Petrópolis, na cidade de mesmo nome (Figura 4). Mais tarde, em 1888, foi fundada na cidade do Rio de Janeiro a “Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia.” e poucos anos depois, em 1891 na cidade de São Paulo, a “Companhia Antártica Paulista” (MORADO, 2009).



**Figura 4.** Rótulos das primeiras cervejas brasileiras: Bohemia, Antarctica e Brahma.

Fonte: Ericksilveira.blogspot.com.br.

Na Primeira Guerra Mundial, a importação de cervejas, principalmente europeias, caiu muito, fazendo com que a produção nacional se mantivesse em níveis bastante elevados. A partir daí o setor cervejeiro se consolidou no País, tornando-se um negócio em ligeira expansão. Atualmente, a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no Brasil. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento define o conceito e as diretrizes para produção dessa bebida.

### **3.3.2. Legislação**

No Brasil a produção e comercialização das cervejas são regulamentadas pelo Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009 que regulamenta a Lei nº8.918 de 14 de Julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas e autoriza a criação da Comissão Intersetorial de bebidas e dá outras providências (BRASIL, 2009).

De acordo com o artigo 36, do decreto citado, a cerveja pode ser definida como:

“Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo.”

O artigo 38 classifica as cervejas quanto ao extrato primitivo, cor, teor alcoólico, teor de malte e ao tipo de fermentação.

I - Quanto ao extrato primitivo:

a) Cerveja leve, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a cinco por cento em peso e menor que dez e meio por cento em peso;

b) Cerveja ou cerveja comum, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a dez e meio por cento em peso e menor que doze por cento em peso;

c) Cerveja extra, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior ou igual a doze por cento em peso e menor ou igual a quatorze por cento em peso; ou

d) Cerveja forte, definida como sendo a cerveja cujo extrato primitivo é maior que quatorze por cento em peso.

#### II - Quanto à cor:

a) Cerveja clara, a que tiver cor correspondente a menos de vinte unidades EBC (European Brewery Convention);

b) Cerveja escura, a que tiver cor correspondente a vinte ou mais unidades EBC (European Brewery Convention); ou

c) Cerveja colorida, a que, pela ação de corantes naturais, apresentar coloração diferente das definidas no padrão EBC.

#### III - Quanto ao teor alcoólico:

a) Cerveja sem álcool, quando seu conteúdo em álcool for menor ou igual a meio por cento em volume, não sendo obrigatória a declaração no rótulo do conteúdo alcoólico; ou

b) Cerveja com álcool, quando seu conteúdo em álcool for superior a meio por cento em volume, devendo obrigatoriamente constar no rótulo o percentual de álcool em volume.

#### IV - Quanto à proporção de malte de cevada:

a) Cerveja de puro malte, aquela que possuir cem por cento de malte de cevada, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;

b) Cerveja, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior ou igual a cinquenta e cinco por cento em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares; ou

c) “Cerveja de ...”, seguida do nome do vegetal predominante, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior que vinte por cento e menor que cinquenta e cinco por cento, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;

#### V - Quanto à fermentação:

a) Baixa fermentação (*lager*); ou

b) Alta fermentação (*ale*).

### **3.4. Matérias-Primas Cervejeiras**

As cervejas possuem como matérias-primas básicas a água cervejeira, malte de cevada e lúpulo e o processo de fermentação é conduzido pelas leveduras cervejeiras. Outras matérias-primas podem substituir parte do malte com o objetivo de diminuir custos ou adicionar novos sabor e aromas à cerveja.

#### **3.4.1. Água Cervejeira**

A água constitui cerca de 90% da cerveja, por isso é a matéria-prima mais abundante desse produto. Para elaboração de cervejas, a água deve ser potável, com as mesmas características adotadas para o consumo humano, atendendo as exigências físicas, químicas, organolépticas e microbiológicas. Entre os principais aspectos, a água deve se apresentar incolor, isenta de impurezas mecânicas e orgânicas, inodora, sabor neutro e deve apresentar pH entre 6,5 e 8,0 (ALMEIDA e SILVA, 2005; ANDRADE et al., 2007).

A água é a matéria-prima mais importante na fabricação de cerveja, sendo as suas características físicas e químicas de fundamental importância para a obtenção de uma cerveja de boa qualidade (MADRID et al., 1996). A sua importância é tanta que ela é um dos fatores decisivos na escolha do local para a instalação de uma cervejaria. Uma água que necessite de muitas correções da qualidade requer um tratamento específico, que resulta no aumento do custo do produto final (VENTURINI FILHO, 2000).

A contaminação da água pode acontecer ao longo de sua distribuição. Entre os fatores que influenciam na contaminação podem ser citados: sólidos insolúveis ou em suspensão, como: pedras, terras, argila; partículas de minério; sólidos dissolvidos, como ferro, manganês e cálcio; por gases, como oxigênio e gás carbônico; contaminantes biológicos ou químicos como sanitizantes e detergentes. A água cervejeira deve estar livre de todas essas impurezas (MORADO, 2009).

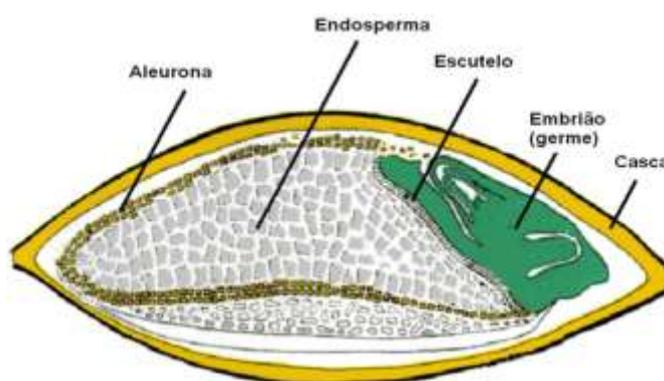
Os avanços na tecnologia de tratamento de águas tornou possível adequar a composição da água para se enquadrar às necessidades do processo de produção da cerveja, como remoção de minerais, purificação e desinfecção (OLIVEIRA, 2011).

### 3.4.2. Cevada e Malte de Cevada

A cevada (*Hordeum vulgare* sp. *Vulgare*), pertencente à família das gramíneas, é um cereal de inverno que ocupa a quinta posição, em ordem de importância econômica no mundo (NAKANO, 2000). A cevada apresenta características que permitiram o sucesso da sua utilização no processo cervejeiro, entre eles: relação amido/proteína, preservação da casca após a colheita, baixo teor de lipídios, variedade de enzimas e gelatinização do amido.

Na elaboração de cerveja, a cevada utilizada é classificada de acordo com as características morfológicas do grão e quanto ao número de fileiras. A cevada pode conter ramos de duas, quatro e seis fileiras de grãos. A cevada com duas fileiras apresenta grãos maiores, com corpo farinhoso mais extenso rico em amido, casca fina, cor mais clara e menor conteúdo de enzimas. Todos os grãos são retos e simétricos e devido ao elevado teor de amido produz malte com maior rendimento (OLIVEIRA, 2011).

A cevada com seis fileiras de grãos apresenta morfologia distorcida (retorcida) devido aos grãos laterais, que não tem espaço suficiente para um crescimento simétrico, tem maior teor de proteínas do que a cevada de duas fileiras e com isso maior quantidade de enzimas. Ideal para ser adicionado ao adjunto como fonte de enzimas naturais (KUNZE, 2009). Anatomicamente, o grão da cevada está dividido em cinco partes principais: casca, embrião, escutelo, aleurona e endosperma (Figura 5).



**Figura 5.** Esquema morfológico de um grão de malte em corte longitudinal.

Fonte: Google Images.

O embrião é a parte viva do grão. O embrião, quando em contato com a água se nutre da reserva de amido (endosperma) formando radículas e a acrospira, dando origem a uma nova planta. Para que esses fenômenos aconteçam o grão desenvolveu uma casca capaz de manter o grão em dormência sem expor o embrião (MOREDO, 2009).

No processo de metabolismo do grão, o escoleto é responsável pela produção de hormônios que migram diretamente para a camada da aleurona. Na aleurona as principais enzimas são produzidas para realizar a digestão das paredes celulares que possuem o amido no seu interior. As principais enzimas são proteases, amilases, glucanases e xilanases (AQUARONE et al., 2001).

A cevada antes de seguir para o processo cervejeiro é transformada em malte de cevada pelas maltarias. O malte (Figura 6) é resultante do processo artificial e controlado de germinação da cevada cervejeira (KUNZE, 2009). Na indústria cervejeira são realizados testes que garantem a qualidade dos grãos de malte, entre eles: teste do chá, parasitas vivos e aspecto morfológico do grão (AMBEV, 2011).



**Figura 6.** Grãos de malte de cevada maltados.

Foto: Patrick Souza.

### 3.4.3. Lúpulo

O lúpulo é a inflorescência feminina da planta dióica classificada como *Humulus lupulus*. Juntamente com o malte, o lúpulo é responsável por agregar o sabor e aroma característicos às cervejas. Os compostos ativos de aroma do lúpulo estão presentes nas glândulas das flores fêmeas da planta e estas geralmente apresentam de 4 a 5 cm de comprimento. O lúpulo possui óleos essenciais (0,2-3%),  $\beta$ -ácidos, também chamados lupulonas (1,5-9,5%) e  $\alpha$ -ácidos (2,0-16,0%) (NOONAN, 1996), também chamados humulonas.

A planta macho possui sementes que diminuem a produção de lupulina, apresentando menor rendimento em compostos aromáticos e de amargor. Por esse motivo apenas as plantas fêmeas podem ser utilizadas para produção de cerveja (KUNZE, 2009).

A planta é uma trepadeira que atinge entre 6 e 8 metros de altura no ápice do seu crescimento e apresenta na base um rizoma. O rizoma é um caule que cresce horizontalmente, geralmente subterrâneo, que funciona como órgão de reprodução vegetativa ou assexuada. A planta mantém-se enraizada no solo durante toda sua vida, necessitando de um suporte para manter-se ereta e crescer em direção à luz abundante (MORADO, 2009).

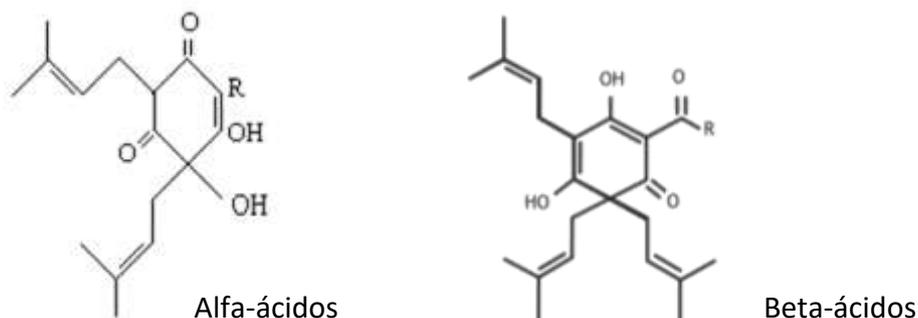
Dependendo de características botânicas da planta, o cone do lúpulo pode variar gerando cones diferentes. Geneticamente as plantas podem produzir mais compostos de amargor ou de aroma. O sabor característico do lúpulo dentro da cerveja é essencial para o impacto organoléptico total da cerveja, a estabilidade do sabor e a retenção da espuma. Os lúpulos podem ser classificados por diferentes critérios: procedência, aroma ou amargor e variedade (KUNZE, 2009)

Os lúpulos responsáveis pelo amargor da cerveja apresentam substâncias amargas que são  $\alpha$ -ácidos, que promovem o “frescor herbal” da cerveja e melhoram a estabilidade da espuma. Como o rendimento da reação de isomerização é afetado pelo tempo e se deseja evaporar mais os óleos terpênicos indesejáveis, o lúpulo de amargor deve ser colocado no início da fervura (AMBEV, 2011).

Os  $\alpha$ -ácidos são isomerizados através de calor, produzindo os iso- $\alpha$ -ácidos, que são constituídos principalmente por isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona. Em vários trabalhos, os iso- $\alpha$ -ácidos têm sido relacionados

com a intensidade do amargor em cervejas e os beta-ácidos com o aroma, entre eles o  $\alpha$ -farneseno (HUGHES, 2000; KEUKELEIRE, 2000).

As estruturas básicas dos ácidos estão representadas na Figura 7. Estes são considerados mais amargos que os ácidos originais não isomerizados, sendo responsáveis por mais de 70% do amargor detectado sensorialmente em cerveja (TECHAKRIENGKRAIL et al., 2004).



**Figura 7.** Estrutura básica dos ácidos do lúpulo: alfa-ácidos e beta-ácidos.

Fonte: Kunze (2009).

Os lúpulos responsáveis pelo aroma da cerveja apresentam compostos que podem conferir à bebida aroma cítrico, herbal, floral, frutal, condimentado, especiarias entre outros conhecidos como  $\beta$ -ácidos; rico em óleos sesquiterpênicos, conferindo um aroma fino à cerveja. Os  $\beta$ -ácidos contribuem em menor intensidade para o amargor (TECHAKRIENGKRAIL et al., 2004).

Eles possuem ação bactericida, agindo no transporte de metabólitos na membrana celular e alterando o pH intracelular (SIMPSON; SMITH, 1992), e uma pronunciada ação bacteriostática sobre Gram-positivas parece estar relacionada à interferência do grupo prenil, presente nas cadeias laterais dos  $\beta$ -ácidos, sobre a membrana plasmática das células, inibindo fortemente o seu crescimento (KEUKELEIRE, 2000).

As antigas cervejarias dosavam o próprio cone do lúpulo no mosto cervejeiro, não havendo processo de extração e concentração dos compostos de interesse. Nesse caso, a dosagem exigia uma quantidade maior de cones para obtenção das características dessa matéria-prima para o mosto.

Natural das zonas temperadas do Hemisfério Norte, o lúpulo é comercializado na forma de flores prensadas, pó, extrato, e principalmente na forma de “pellets” (Figura 8) feitos a partir das flores não polinizadas que têm maior concentração de substâncias aromáticas. Os países mais importantes no cultivo de lúpulo são: Alemanha, Estados Unidos, República Tcheca, China e Ucrânia (HAMPSON, 2014).



**Figura 8.** Pelletes de lúpulo.

Fonte: Hominilupulo.com.br.

#### **3.4.4. Levedura Cervejeira**

Dentre os parâmetros que definem a qualidade das cervejas, as leveduras utilizadas no processo fermentativo são de grande importância. As leveduras são fungos que se apresentam predominantemente na forma unicelular e se reproduzem assexuadamente por gemulação ou brotamento (ALMEIDA e SILVA, 2005).

As leveduras possuem a habilidade de metabolizar eficientemente os constituintes do mosto que é um caldo resultante da mistura fervida de malte e água, rico em açúcares fermentáveis. Esse caldo é filtrado para receber o lúpulo e o fermento, sendo transformado em álcool e gás carbônico, a fim de produzir uma cerveja com qualidade e estabilidade sensorial satisfatória (CARVALHO et al., 2006). As leveduras mais utilizadas em cervejaria são de duas espécies do gênero *Saccharomyces*: *Saccharomyces cerevisiae* (alta fermentação) e *Saccharomyces uvarum* (baixa fermentação).

As células de leveduras podem ser esféricas, ovais ou elípticas podendo ainda apresentar-se bastante alargadas, não possuem flagelo e, em consequência disso, são imóveis. Possuem capacidade de esporulação, importante para manter a viabilidade das espécies durante as variações do meio ambiente. São constituídas por água, 68% a 83%, substâncias nitrogenadas, carboidratos, lipídios, vitaminas (KUNZE, 2009).

O tempo máximo de armazenamento é determinado em função da viabilidade e da vitalidade das células. A viabilidade é uma análise que avalia a capacidade de fermentação das células vivas e a vitalidade verifica a quantidade de células que estão vivas. Quanto maior o teor de células vivas (acima de 90 %) melhor será conduzido o processo de fermentação, ou seja, a cerveja apresentará características sensoriais agradáveis e fermentará o mais breve possível. As leveduras podem ser reutilizadas em fermentações posteriores desde que apresentem características de viabilidade e vitalidade dentro do esperado (AMBEV, 2011).

#### **3.4.5. Adjuvantes do Processo Cervejeiro**

A legislação brasileira permite a utilização de matérias-primas ricas em carboidrato para substituir uma parte do malte de cevada no processo cervejeiro. Essa matéria-prima é chamada de adjuvante (BRASIL, 2009). As grandes cervejarias utilizam vários adjuvantes com o objetivo de minimizar custos e muitas vezes de atribuir características sensoriais à cerveja.

A utilização do adjuvante pode influenciar no teor de proteínas e aminoácidos disponíveis no mosto, na formação de substâncias corantes, aroma, teor em glucanos, teor em lipídios e até mesmo na fermentabilidade dos açúcares obtidos dos adjuvantes (AMBEV, 2011). Por esses motivos, o adjuvante deve ser cuidadosamente incorporado nas receitas cervejeiras.

As principais fontes de carboidratos utilizadas na indústria como adjuvante são o arroz, milho, cevada não-maltada, sorgo e trigo entre outros. Antes de serem incorporadas no processo cervejeiro essas matérias-primas passam por tratamentos específicos para facilitar a armazenagem e o processo dentro da cervejaria. As formas de emprego de adjuvante mais utilizadas são o griz, a farinha e os xaropes concentrados (MORADO, 2009).

Ao selecionar os adjuntos a serem utilizados na cervejaria, os cervejeiros devem considerar alguns aspectos, como o estilo de cerveja desejado, a capacidade dos equipamentos envolvidos, os nutrientes essenciais para a levedura e a capacidade de armazenagem. Os adjuntos devem ser ricos em carboidratos e ter baixa concentração de proteínas e lipídios. Além disso, os custos, a disponibilidade de estocagem e de dosagem também são fatores essenciais.

Novos adjuntos têm sido empregados na produção de cervejas, como: arroz preto, na forma de cereal inteiro; farinha de pupunha (fruto amazônico), na forma de farinha; beterraba; banana entre outros. Esses adjuntos têm sido empregados em estudos científicos em universidades brasileiras mostrando resultados promissores para a indústria cervejeira (SOUZA, 2010).

### **3.5. Cerveja Artesanal e o Mercado Cervejeiro**

A cultura da valorização da qualidade da cerveja está aumentando com o surgimento de novas cervejas fabricadas de modo artesanal. Estas bebidas possuem atributos de diferenciação muito específicos quando comparadas as cervejas *mainstream*. São cervejas que oferecem um arsenal de aromas e sabores ao consumidor. Esse diferencial vem aumentando o consumo das cervejas artesanais no Brasil (RODRIGUES, 2010).

A influência da imigração alemã, principalmente nos Estados do Sul do Brasil, fez com que as cidades dessa região mantivessem algumas tradições dessas famílias. A fabricação das cervejas artesanais contribui para o fortalecimento do turismo e cultura da região (CLUBBER, 2015). Outras cervejarias artesanais surgem e ganham destaque, como consequência do crescimento deste mercado (SOUZA; LANG, 2014).

## 4. Material e Métodos

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Material**

As cervejas são constituídas em sua maior parte por água, com cerca de 90 % da sua composição, os demais ingredientes são malte de cevada, lúpulo e levedura cervejeira. No presente trabalho foram utilizadas como matérias-primas: água cervejeira, malte de cevada, lúpulo amargor, lúpulo aromático, extrato e óleo essencial do rizoma de *Zingiber zerumbet* e leveduras cervejeiras.

#### **a) Água Cervejeira**

A água cervejeira deve conter características da água potável, ou seja, inodora, incolor, sem sabor. Para realização desse trabalho foi utilizada água obtida de poço artesiano distribuída no Campus do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

#### **b) Malte de Cevada**

O malte utilizado foi malte claro Agromalte de origem comercial; foi armazenado em local livre de umidade até o momento do uso, quando foi triturado com moinho de grãos e adicionado na água.

#### **c) Lúpulo**

Foram utilizados os lúpulos amargo e aromático na forma de pelletes comercial adquiridos pelo site [cervejando.com.br](http://cervejando.com.br).

#### **d) Gengibre Amargo**

O material botânico *Z. zerumbet* foi coletado no horto da Coordenação de Pesquisas de Produtos Naturais (CPPN), sua identificação foi realizada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pelo Prof. Dr. Paul Maas (Departamento of Plant Ecology and Evolutionary Biology), depositada no herbário sob o número de exsicata n. 186913.

#### **e) Leveduras**

Foi utilizada levedura *Saccharomyces cerevisiae*, tipo Safale US-05, da marca Fermentis, comercial, específica para cerveja do tipo Ale, ou seja, para

fermentação conduzida em temperatura ambiente com floculação da levedura ao término desse processo.

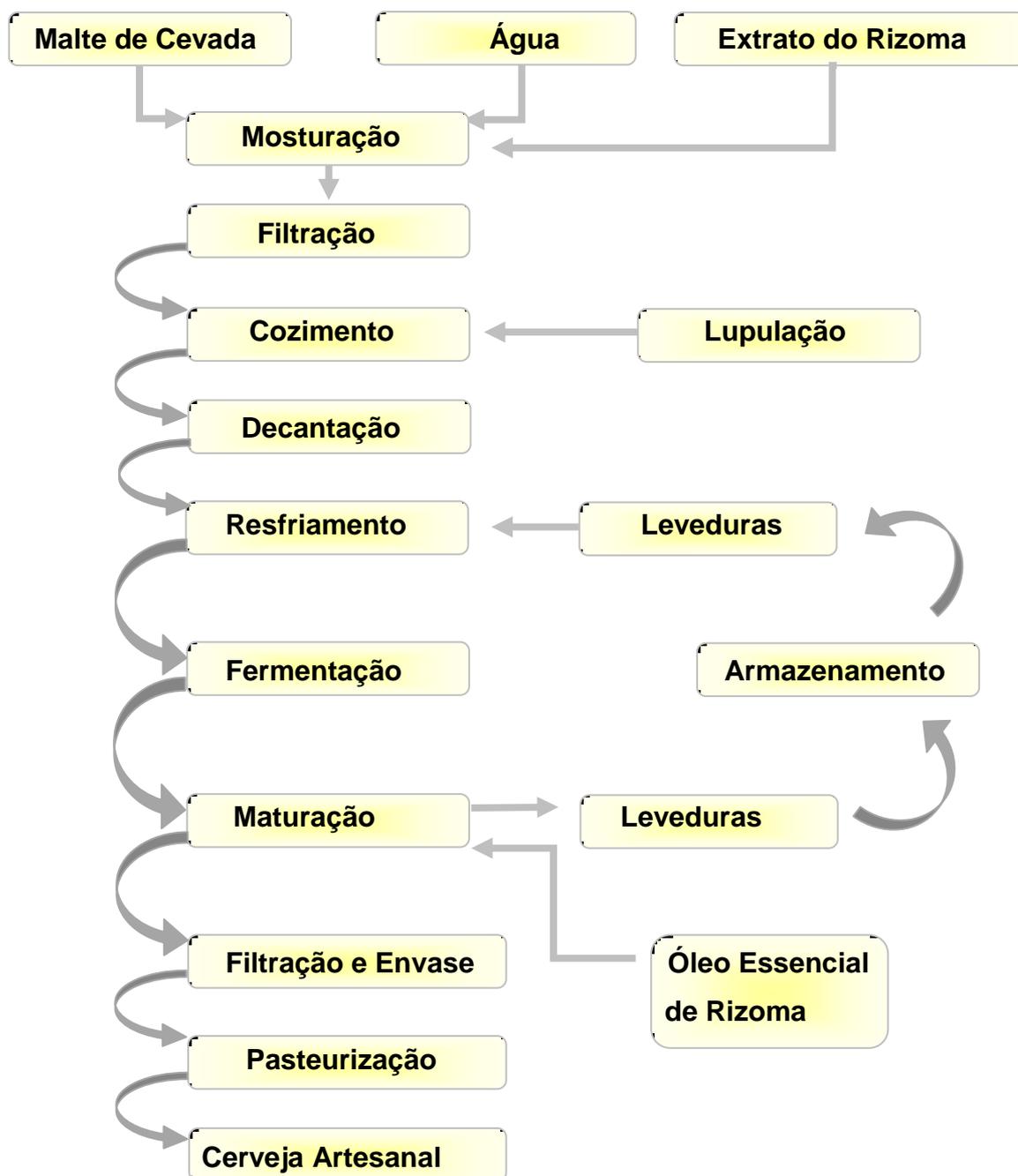
#### **4.2. Delineamento Experimental**

O experimento consistiu na elaboração de uma cerveja artesanal de alta fermentação, adicionada de extrato e óleo essencial de gengibre amargo, *Zingiber zerumbet*, conforme Figura 9.

A cerveja foi preparada com extrato aparente similar as cervejas já comercializadas no mercado local para que o consumidor possa ter a mesma aceitação do produto.

O rizoma foi adicionado na cerveja na forma de extrato e óleo essencial. O extrato do rizoma, que contém partes sólidas, foi adicionado na brassagem antes da etapa de filtração e óleo essencial foi utilizado na etapa de maturação, após a retirada das leveduras.

O processo de adição de insumos e matérias-primas após a fermentação é ideal para evitar que a eficiência fermentativa das leveduras seja afetada.



**Figura 9.** Delineamento experimental com as etapas resumidas do processo de produção da cerveja artesanal com gengibre amargo.

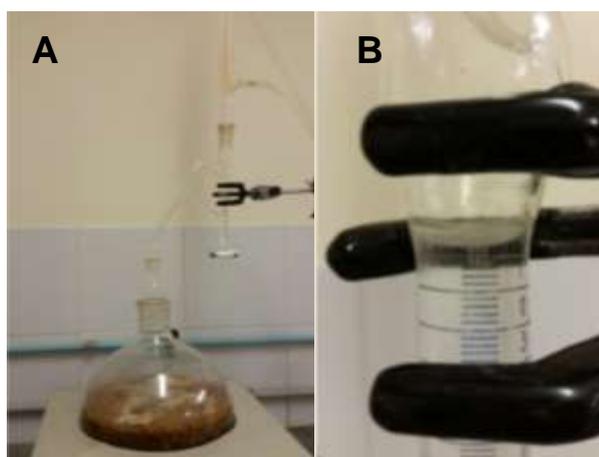
### 4.3. Processamento do Rizoma de Gengibre Amargo

Os rizomas do *Zingiber zerumbet* foram levados ao Laboratório Temático de Química e Produtos Naturais (LTQPN), do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). O gengibre foi selecionado quanto ao grau de injúrias, lavado em água corrente e seco. O rizoma foi avaliado quanto à morfologia e coloração por método visual direto.

O rizoma foi seco por um período de 72 horas, à temperatura ambiente, pesado em balança semi analítica, cortado em pequenas fatias e processados *in natura* em um extrator de sucos, modelo HJE60SA. Em seguida, foi extraído o óleo essencial por meio de hidrodestilação do bagaço que foi isolado e analisado. Essas duas matérias-primas foram utilizadas na elaboração da cerveja artesanal, em diferentes etapas do processo.

#### 4.3.1. Extração do Óleo Essencial por Hidrodestilação

A extração do óleo essencial do rizoma foi realizada pelo método de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger (Figura 10), acoplado em um balão de 2000 mL. O *Zingiber* em pó foi adicionado de água, na proporção de 0,5 kg/L e levado à manta aquecedora. A extração foi feita durante 6h, contadas a partir da ebulição. O óleo foi coletado (Figura 9) no condensador, o sistema protegido da luz com auxílio de um papel alumínio e foi armazenado em frasco de cor âmbar e congelado até momento do uso (AOAC, 2008).



**Figura 10.** Em (A) processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Em (B) o óleo essencial extraído do rizoma.

Fotos: Patrick Souza.

#### **4.3.2. Cálculo do Rendimento do Óleo Essencial**

O rendimento foi determinado pela relação massa/massa e relação volume/massa. As massas dos óleos essenciais foram determinadas em balança analítica, seus valores comparados às respectivas massas do *Z. zerumbet* em pó utilizado e os volumes foram determinados pela leitura no aparelho de Clevenger (TALLON-NETTO, 2004).

#### **4.3.3. Análises Fitoquímicas do Óleo Essencial e da Cerveja Artesanal**

Foram realizadas no Laboratório de Farmacologia e Produtos Naturais do INPA as análises dos compostos orgânicos presentes no óleo do rizoma de *Z. zerumbet* e na Cerveja Artesanal pela triagem fitoquímica. Os testes realizados tiveram valor qualitativo para os metabólitos secundários (MATOS, 2009).

##### **a) Esteroides, Terpenoides e Triterpenoides**

Uma amostra de 2 mL foi misturado com 2 mL de clorofórmio. A solução de clorofórmio foi filtrada em algodão com decigrama de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, antes de ser misturada ao extrato. Foi adicionado 1 mL de anidro acético, agitado suavemente e acrescentado de três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. Após suave agitação, os tubos foram deixados em descanso para observação da coloração indicativa de esteroides (azul) e triterpenoides (verde). Conforme a Reação de Lieberman-Burchard (MATOS, 2009).

##### **b) Taninos**

Uma amostra de 2 mL foi adicionada de três gotas de solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub>, em seguida foi homogeneizada e colocada em descanso. A presença de precipitado azul indica que a amostra apresenta taninos hidrolisáveis e a coloração verde indica taninos condensados (MATOS, 2009).

##### **c) Saponinas**

Um amostra de 2 mL foi adicionado 2 mL de clorofórmio e 5 mL de água destilada, a mistura filtrada. Em seguida, a solução foi agitada por 3 minutos. A presença de espuma é um indicador de saponinas (MATOS, 2009).

#### d) Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonoides

Neste teste foram utilizados tubos de ensaio e um deles foi acidulado a pH 3, outro alcalinizado a pH 8,5 e o terceiro a pH 11. Foram observadas mudanças da coloração do material quando na presença dos compostos (MATOS, 2009).

#### e) Cromatografia Gasosa do Óleo Essencial

Para preparo da amostra foi injetada no cromatógrafo gasoso, acoplado a espectrômetro de massas, 1 µL de amostra diluído em 1 mL de diclorometano. O equipamento utilizado foi um cromatógrafo SHIMADZU, modelo QP2010MS. Para leitura do espectro de massas foi utilizado modo scan (40-600 m/z) e a coluna capilar (30 m de comprimento com 0,25 d.i. e 0,25 µL de filme) com uma fase estacionária composta de 5% de fenil-metil polisiloxano.

### 4.3.4. Análises Físico-Químicas do Rizoma

#### a) Umidade

A análise de umidade foi realizada por gravimetria de acordo com as Normas Analíticas do Instituto Adolpho Lutz – IAL (2008). A análise foi realizada pesando-se um grama de amostra em cápsulas de alumínio previamente secas e pesadas. Em seguida, as cápsulas contendo amostra foram colocadas em estufa, com circulação de ar forçada, a 105°C até peso constante. Os resultados obtidos foram expressos em g.100g<sup>-1</sup> de matéria integral.

$$MS (g.100g^{-1}) = \frac{P_{mf} - P_{ms}}{P_{mf}} \cdot 100$$

Onde:

- $MS (g.100g^{-1}) =$  Matéria seca
- $P_{mf} (g) =$  Peso do extrato
- $P_{ms} (g) =$  Peso do extrato desidratado

$$Umidade (g.100g^{-1}) = 100 \% - MS$$

### b) Cinzas

O teor de cinzas foi determinado por gravimetria, de acordo com IAL (2008). Dois gramas de amostra foram pesadas, em cadinho previamente calcinado e com peso conhecido. A amostra foi incinerada em mufla a 550 °C, resfriada em dessecador e novamente submetida à pesagem. Os resultados foram expressos em  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de cinza.

$$\text{Cinza (g} \cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{P}{A} \cdot 100$$

Onde:

- $P$  (g) = cinza, ou amostra final
- $A$  (g) = amostra inicial

### c) Lipídios

O teor de lipídios foi determinado por gravimetria, de acordo com os métodos do IAL (2008). Três gramas de amostra de extrato foram transferidas para um cartucho de papel filtro previamente pesado. Em seguida, o cartucho foi posicionado no aparelho Soxhlet para extração dos lipídios.

O processo foi realizado em aproximadamente 24 horas, sob sucessivas lavagens da amostra para arraste de lipídios. Por fim, a amostra foi drenada para um balão de fundo chato previamente seco e de peso conhecido e foi levada ao banho Maria para evaporação do éter e, em seguida, colocada em estufa a 105 °C até peso constante. O resultado foi expresso em  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de lipídio.

$$\text{Lipídios (g} \cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{P}{A} \cdot 100$$

Onde:

- $P$  (g) = lipídio, ou amostra final
- $A$  (g) = amostra inicial

### d) Fibra Total

O teor de fibra total foi determinado por gravimetria, conforme descrição do IAL (2008). Uma amostra de 0,5 g de extrato seco e desengordurado foi tratada com ácido e base e, em seguida, filtrada em cadinho de Gooch com auxílio de bomba a vácuo.

A amostra foi submetida a sucessivas lavagens, com água destilada a temperatura de  $80\pm 1^\circ\text{C}$ , até a neutralidade da amostra. Após esta etapa a amostra foi para a estufa, com circulação de ar forçada, à temperatura de  $105^\circ\text{C}$ , até peso constante. O resultado foi expresso em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de fibra total.

$$\text{Fibras Totais (g}\cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{P}{A} \cdot 100$$

Onde:

- $P$  (g) = fibra, ou amostra final
- $A$  (g) = amostra inicial

### e) Proteínas

O teor de proteínas foi determinado a partir da matéria seca, pelo método Micro-Kjeldahl, segundo metodologia do IAL (2008). Foram pesados 0,5 g da amostra em papel vegetal, que foi depositado em um tubo de ensaio próprio para elevadas temperaturas. Foram adicionados 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, 300 mg de sulfato de potássio e 300 mg de sulfato de cobre. Os tubos foram posicionados em um bloco digestor até total digestão, observada pela coloração esverdeada translúcida da amostra.

Neste processo, a temperatura inicial foi de  $50^\circ\text{C}$ , sendo elevada até  $350^\circ\text{C}$ . Em seguida, foi realizada a destilação em aparelho Kjeldahl com o uso de 15 mL de NaOH 50%. O material destilado foi coletado (cerca de 75 mL) em um erlenmeyer contendo 15 mL de ácido bórico e 3 gotas da solução indicadora e submetido a titulação com HCl 0,02 mol/L. Os resultados foram expressos em  $\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$  de proteína total.

$$\text{Proteína (g}\cdot 100\text{g}^{-1}) = \frac{V_{\text{HCl}} \cdot M_{\text{HCl}} \cdot 14 \cdot F \cdot 100}{P}$$

Onde:

- $V_{\text{HCl}}$  (mL) = volume gasto de HCl
- $M_{\text{HCl}}$  (molaridade) = molaridade do ácido clorídrico
- $F$  = fator de correção do ácido
- $P$  (g) = peso da amostra

#### **f) Carboidratos**

A leitura dos carboidratos foi realizada de acordo com IAL (2008). O resultado foi calculado por diferença a partir da soma dos resultados de cinzas, fibras, lipídios, proteínas e umidade, subtraídos de 100. O resultado foi expresso em  $\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$ .

#### **g) Valor Energético**

A metodologia seguida para determinação do valor energético foi a descrita por DE ANGELIS (1977). O valor calórico foi calculado utilizando-se os seguintes fatores de conversão de Atwater: 9 Kcal por um g de lipídios, 4 Kcal por g de proteínas e 4 Kcal por g de carboidratos. Os resultados foram expressos em  $\text{kcal} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de matéria integral.

#### **h) Potencial Hidrogeniônico (pH)**

As análises foram realizadas por leitura direta em pHmêtro conforme a metodologia descrita pelo IAL (2008). Foram pesados 10 g de amostra sólida do extrato que foi diluído em 10 mL de água destilada. O resultado foi expresso em número inteiro seguido da sigla pH.

### **4.3.5. Análises Químicas de Minerais do Rizoma**

O rizoma foi analisado quando a presença de metais, por meio do ensaio de varredura dos minerais existentes na amostra, pela técnica de Espectrometria de Raio-X. Para realização da análise foi utilizado o método de *Screening* no equipamento de Raio-X de Fluorescência, marca SHIMADZU, modelo EDX720.

## **4.4. Análises do Malte de Cevada**

### **a) Presença de Parasitas**

O malte de cevada foi avaliado quanto a presença de parasitas vivos, que podem infestar essa matéria-prima, prejudicando o rendimento do grão e obtenção da mesma densidade do mosto em processo de repetitividade. Uma amostra de 500 g foi avaliada para identificação de parasitas, através de análise visual simples com auxílio de uma lupa (KUNZE, 2009).

## **b) Teste do Chá**

Uma amostra de 100 g do malte de cevada foi acondicionada em um Erlenmeyer de 500 mL, ao qual foi adicionado 250 mL de água quente, sendo a vidraria fechada. Após uma hora de contato da água quente com o malte de cevada, o aroma da solução foi avaliado na saída do recipiente. Odores de graxa, óleo, mofo e metálico, são alguns exemplos que podem reprovar a amostra, impedindo sua utilização no processo cervejeiro (KUNZE, 2009).

## **c) Análise Morfológica do grão de Malte**

Uma amostra de 100 g de cada malte foi avaliada com auxílio de uma lupa por meio de análise visual para identificação de grãos consumidos por parasita, sendo que machas coloridas podem ser um indicador da presença de microrganismos deteriorantes ou excesso de radículas que pode implicar no rendimento do grão em amido disponível (KUNZE, 2009).

## **4.5. Elaboração do Mosto Cervejeiro**

### **4.5.1. Moagem do Malte de Cevada**

O processo de elaboração da cerveja iniciou com a moagem do malte, mostura e filtração para remoção do bagaço. Em seguida o mosto foi adicionado de lúpulo e levado à cocção e então resfriado. A moagem dos grãos de malte de cevada iniciou com a maceração dos grãos com a finalidade de obter um substrato com maior área de superfície exposta, preservando a integridade do tegumento (popularmente conhecido como casca), aumentando assim, a hidrólise do amido durante a mosturação (ALMEIDA E SILVA, 2005).

### **4.5.2. Mosturação e Filtração do Mosto**

O malte moído e o extrato do rizoma foram acrescidos de água na proporção de 4:1 e, em seguida, foram submetidos à mosturação. Esse processo envolveu uma rampa de temperaturas em função do tempo, com o objetivo de hidrolisar moléculas de proteínas e carboidratos. Esse processo aconteceu de forma sequencial para evitar choque térmico das enzimas do malte. Dessa forma a temperatura ótima das principais enzimas foi atingida durante a mostura (CARVALHO et al, 2007).

Ao final do processo de mostura a temperatura foi elevada a 78 ° C para desnaturação dos principais grupos de enzimas. Ao sair da mostura a solução foi filtrada para remoção da parte sólida, o bagaço. Esse processo é conhecido como extração de mosto primário. O bagaço retido na filtração foi lavado com água quente (80 °C), para o total arraste e diluição apropriada de açúcares fermentescíveis, constituindo no mosto secundário. O bagaço residual é descartado e pode ser utilizado como adubo ou ração animal (CARVALHO et al, 2007).

O mosto filtrado, constituído pelo mosto primário e secundário, foi levado para o cozinhador onde foi submetido à cocção (100 °C) por 90 minutos. Durante esta etapa foi adicionado o lúpulo amargor em pellets, que contém substâncias que, sob altas temperaturas, sofrem transformações químicas e conferem à cerveja o sabor e aroma característicos (KUNZE, 2009).

#### **4.5.3. Cozimento e Resfriamento do Mosto**

O cozimento promove a esterilização, a coagulação de proteínas e a remoção de compostos voláteis indesejáveis do mosto. Após esta etapa o mosto foi induzido à decantação, processo que ocorre dentro do próprio cozinhador sem aquecimento, para retirada de trub, uma mistura de proteínas coaguladas. Após a decantação, o mosto foi resfriado com auxílio de uma serpentina de inox, chegando a temperatura de 15±1 °C e inoculado com leveduras cervejeiras (SENAI, 1997).

### **4.6. Fermentação da Cerveja**

#### **4.6.1. Inoculação do Fermento e Fermentação**

O processo de fermentação foi iniciado após a inoculação das leveduras no mosto na proporção de 0,15 g.L<sup>-1</sup>. Durante a transferência para os tanques o mosto foi aerado para ativar a via respiratória das leveduras, essencial para o processo de multiplicação celular. Nessa fase, as leveduras consomem os açúcares fermentescíveis para produzirem etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e também alguns ésteres, ácidos e alcoóis superiores que atribuem propriedades organolépticas à cerveja (SOUZA, 2010).

A fermentação foi conduzida a 15 °C, até atingir a redução do extrato a níveis constantes e fim da produção de gás carbônico. Em seguida, uma massa de leveduras ficou depositada na parte inferior do tanque de fermentação. A cerveja foi trasfegada para outro tanque com a finalidade de realizar a separação física das leveduras que foram analisadas quanto ao teor de células vivas e descartadas (KUNZE, 2009).

#### **4.6.2. Monitoramento dos Processos Fermentativos**

Durante o processo fermentativo da cerveja foram coletadas alíquotas a cada 24 horas para as seguintes avaliações:

##### **a) Extrato Original, Extrato Aparente, Fermentabilidade e Teor Alcoólico.**

As análises foram realizadas conforme a metodologia de European Brewery Convention - EBC (1987), utilizando aparelho Beer Analyser, específico para leitura de cerveja, um equipamento multiparamétrico com leitura por meio de espectrofotometria.

Uma amostra de 200 mL de cerveja foi descarbonatada por agitação, em Erlemmeyer até completa eliminação dos gases presentes na cerveja e com auxílio de uma seringa, 10 mL de cerveja foram injetados no aparelho Beer Analyser II. Os resultados foram expressos em grau plato (°P) de extrato original e extrato aparente, percentual (%) para leitura da fermentabilidade e percentual de volume por volume (% v.v) de teor alcoólico.

##### **b) Temperatura**

Um Erlemmeyer com glicerina que foi colocado no mesmo ambiente da bebida e a temperatura da glicerina foi avaliada com auxílio de um termômetro para evitar contato direto com o produto.

#### **4.6.3. Contagem de Células Vivas**

A quantificação do número de células vivas foi realizada a partir de uma amostra de 10 mL de leveduras foi adicionada de azul de metileno, sendo classificadas como viáveis as células que não absorveram o corante. Através da contagem realizada em uma câmara de Neubauer (MORAES; ALVES, 1986).

## **4.7. Maturação, Filtração e Obtenção da Cerveja**

### **4.7.1. Maturação e Filtração**

Após a retirada das leveduras a cerveja fermentada foi adicionada de óleo essencial de rizoma de gengibre amargo. O processo de maturação foi conduzido a 0 °C por 10 dias. Após esta etapa, as bebidas foram filtradas com terra infusória diatomácea.

### **4.7.2. Envase**

As garrafas de vidro utilizadas para envasar a cerveja foram lavadas com água corrente, escovadas manualmente e colocadas em solução com 2,5% de hidróxido de sódio a 85 °C para limpeza interna, para remoção de carga orgânica. Em seguida, passaram por sucessivas lavagens em água destilada e seca em estufa.

O envase foi realizado com auxílio de uma provadeira pela lateral da garrafa, após enchimento as garrafas foram lacradas com rolha metálica comercial e submetidas a pasteurização a 65°C, por 30 minutos, em banho Maria. As cervejas foram caracterizadas quanto a sua composição físico-química, microbiológica e sensorial.

## **4.8. Caracterização Físico-Química, Microbiológica e Sensorial da Cerveja**

### **4.8.1. Caracterização Físico-química**

#### **a) Potencial Hidrogeniônico (pH)**

As análises do potencial hidrogeniônico das cervejas foram realizadas por leitura direta em pHmêtro conforme a metodologia descrita pelo IAL (2008), de acordo com o item 4.3.1h.

#### **b) Extrato aparente, extrato real, fermentabilidade e teor alcoólico**

As análises foram realizadas conforme descrito no item 4.6.2a.

#### **c) Dicetonas totais**

A análise foi realizada conforme metodologia da EBC (1987). Foi realizada a partir da destilação de uma solução contendo 100 mL de cerveja e de 25 mL de água destilada. Foram coletados 24 mL da amostra destilada que,

em seguida, foi transferida para um balão de 25 mL e avolumada com água destilada.

A partir desta solução, foram pipetados 10 mL de amostra em um tubo de ensaio que foi acrescido de 0,5 mL de solução de orto-fenilidiamina. Após repouso de 35 minutos foram adicionados 2 mL de HCl 4 M, seguido de homogeneização. A leitura foi realizada em espectrofotômetro, a um comprimento de onda de 335 nm. Os resultados foram expressos em ppm.

$$DT = A_{335} \times 2,4 \times f$$

$$DT_{12^{\circ}P} = \frac{DT \times 12}{EP}$$

Onde:

- $DT$  = Dicetonas totais (ppb).
- $A_{335}$  = Absorbância da amostra a 335 nm.
- $f$  = Fator determinado através da calibração do espectrofotômetro.
- $DT_{12^{\circ}P}$  = Dicetonas totais a 12°P
- $EP$  = Extrato primitivo.

#### d) Amargor

A análise foi realizada conforme metodologia da EBC (1987). Uma gota de álcool 1-octílico foi gotejada em uma proveta e, em seguida, misturada com 10 mL de cerveja. Essa mistura foi transferida para um erlenmeyer de 125 mL com rolha, contendo uma tira plástica e 3 pérolas de vidro com a finalidade de manter o processo bifásico.

Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de HCl 6 M e 20 mL de isoctano, após ser tampado, foi realizada a agitação por 20 minutos em agitador orbital, a 180 rpm, sendo este processo facilitado pelas pérolas de vidro adicionadas a mistura anteriormente. Em seguida, a fração superior (límpida) da solução bifásica foi transferida para um tubo de ensaio com tampa rosqueada. A leitura da amostra foi realizada em espectrofotômetro a 275 nm.

$$Am = A_{275} \times f \times 57$$

$$Am_{12^{\circ}P} = \frac{Am \times 12}{EP}$$

Onde:

- $Am$  = Amargor (BU)
- $A_{275}$  = Absorbância da amostra a 275 nm.
- $f$  = Fator determinado através da calibração do espectrofotômetro.
- $Am_{12^{\circ}P}$  = Amargor a 12°P
- $MB$  = Mosto básico.

### e) Cor

A determinação da cor da cerveja foi realizada por espectrofotometria seguindo o método da EBC (1987). A absorção de luz é medida num comprimento de onda de 430nm. O método requer que as amostras analisadas sejam filtradas e que apresentem turbidez inferior a 1 EBC. Uma amostra de 400 mL de cerveja foi descarbonatada e filtrada com terra diatomácea infusória, a partir do filtrado foi realizada a leitura.

$$C = A_{430} \times f_1 \times f_2 \times 25$$

Onde:

- $Cor = Cor (EBC)$
- $A_{430} = Absorbância da amostra a 430 nm.$
- $f_1 = Fator de diluição da amostra.$
- $f_2 = Fator do espectrofotômetro a 430 nm.$

### f) Turvação em 24h

A análise foi realizada conforme a metodologia da EBC (1987). Uma amostra de 100 mL de cerveja foi colocada em banho de álcool a 0 °C por um período de 24 horas. Em seguida, foi retirada do banho e foi realizada a leitura em aparelho turbidímetro. Os resultados foram expressos em EBC.

$$T = L \times f$$

Onde:

- $T = Turvação (EBC)$
- $f = Fator de calibração do turbidímetro$

## 4.8.2. Variáveis de Resposta do Bioprocesso

As variáveis de respostas do bioprocesso foram: fator de rendimento de produção de etanol ( $Y_{P/S}$ ), fator de rendimento substrato em células ( $Y_{X/S}$ ), produtividade volumétrica ( $Q_p$ ), taxa específica de crescimento celular ( $\mu_x$ ) e eficiência fermentativa ( $EF$ ).

### a) Fator de Rendimento Substrato em Produto ( $Y_{P/S}$ )

O fator de rendimento de produção de etanol foi calculado pela relação entre gramas de etanol produzido e açúcares totais consumidos ( $g_P g_S^{-1}$ ). Através da relação entre a concentração do produto final pela diferença da

concentração do substrato inicial e concentração do substrato final. O resultado foi expresso em  $g.L^{-1}$ . O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

Onde:

- $P$  = Concentração de produto final ( $g.L^{-1}$ )
- $P_0$  = Concentração de produto inicial ( $g.L^{-1}$ )
- $S$  = Concentração do substrato final ( $g.L^{-1}$ )
- $S_0$  = Concentração de substrato inicial ( $g.L^{-1}$ )

### b) Fator de Rendimento de Substrato em Células ( $Y_{X/S}$ )

O rendimento foi calculado em gramas de células por grama de extrato consumido ( $g.g^{-1}$ ), por meio da relação entre a variação da massa de células em função do substrato consumido. O resultado foi expresso em  $g.L^{-1}$ . O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta X}{\Delta S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S}$$

Onde:

- $X$  = Massa Celular Final ( $g.L^{-1}$ )
- $X_0$  = Massa Celular Inicial ( $g.L^{-1}$ )
- $S$  = Conc. do substrato final ( $g.L^{-1}$ )
- $S_0$  = Conc. de substrato inicial ( $g.L^{-1}$ )

### c) Produtividade Volumétrica ( $Q_p$ )

Foi quantificada em gramas de etanol produzida por Litro de meio fermentado, por hora ( $g.P.L^{-1}.h^{-1}$ ). Através da divisão do valor em  $g.L^{-1}$  de etanol, na cerveja, pelo tempo em horas de fermentação. O resultado foi expresso em  $g.L^{-1}$ . O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$Q_p = \frac{P}{t}$$

Onde:

- $P$  = Produto (etanol) ( $g.L^{-1}$ )
- $t$  = Tempo de fermentação em horas ( $h$ )

#### d) Eficiência Fermentativa (EF).

A relação entre o rendimento em produto do processo ( $Y_{P/S}$ ) e o rendimento teórico determinaram a eficiência do processo fermentativo do mosto para elaboração da cerveja. O resultado foi expresso em porcentagem de Eficiência de Fermentação. O cálculo foi baseado na seguinte equação:

$$EF = \frac{Y_{P/S}}{0,511} \cdot 100$$

Onde:

- $EF$  = Eficiência fermentativa
- $Y_{P/S}$  = Rendimento em produto.

#### 4.8.3. Avaliação Microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas a partir de alíquotas das cervejas acondicionadas em garrafas submetidas à pasteurização.

##### a) Contagem Total de Bactérias Lácticas

Para determinação da contaminação das cervejas por bactérias lácteas uma amostra de 1 mL de cerveja foi inoculada em meio de cultura Raka Ray (SILVA, 1997). O meio foi preparado conforme descrição do fornecedor SIGMA ALDRICH. Para o preparo do meio de cultura utilizado para identificação de bactérias lácteas foram pipetados 10 mL de Mono-Oleato de Sorbitan e 7 mL de solução de actidiona 0,1% e o pH foi corrigido para 5,4 com  $H_2SO_4$  1 N.

A mistura foi dissolvida sob aquecimento, em seguida, distribuída em placas de Petri e esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento foi adicionado 1 mL de 2-feniletanol, com cuidados assépticos e foi realizado o inóculo. O meio foi colocado em uma incubadora a 30 °C por 7 dias. A leitura foi realizada através da contagem de colônias desenvolvidas e o resultado expresso em UFC.mL<sup>-1</sup>.

##### b) Contagem de Bactérias Gram-negativas

Para determinação da contaminação da cerveja por bactérias gram-negativas (BGN) uma amostra de 1 mL de cerveja foi inoculada em meio de cultura WLN (SILVA, 1997).

O meio foi preparado conforme descrição do fornecedor do meio de cultura. Para o preparo do meio de cultura para identificação de BGN foram pesados 7,5 g, de meio de cultura que foi dissolvido 100 mL de água destilada. O pH foi corrigido com NaOH 1 M até atingir pH 5,5. A mistura foi dissolvida até ebulição, em seguida, distribuída em placas de Petri e esterilizada em autoclave a 121 °C por 15 minutos. O meio foi colocado em uma incubadora a 30 °C, por 7 dias. Foi realizada a contagem de colônias e o resultado expresso em UFC.mL<sup>-1</sup>.

### **c) Contagem de Leveduras Selvagens**

Uma amostra de 1 mL de cerveja foi inoculada em meio de cultura YM (fornecedor SIGMA ALDRICH) com CuSO<sub>4</sub> (SILVA, 1997).

Para o preparo do meio de cultura para identificação de leveduras selvagens foram pesados 4,1 g de meio de cultura, que foi dissolvido em 100 mL de água destilada. A mistura foi dissolvida até ebulição, em seguida, distribuída em placas de Petri e esterilizada em autoclave a 121 °C, por 15 minutos. Foi adicionado sulfato de cobre ao meio (50 mL.L<sup>-1</sup>). O meio foi colocado em uma incubadora a 10 °C por 7 dias. A leitura foi realizada através da contagem de colônias e o resultado expresso em UFC.mL<sup>-1</sup>.

#### **4.8.4. Análise Sensorial**

A cerveja foi caracterizada quanto aos seus atributos sensoriais de aroma e sabor, por seis provadores treinados em análise sensorial de cervejas, todos profissionais do quadro de degustadores da uma cervejaria localizada na cidade de Manaus. Foi disponibilizada uma amostra de 100 mL da amostra para cada degustador realizar a análise descritiva. Ao término da análise foi redigido um laudo e as características notadas por todos foram tomadas como atributos característicos da cerveja avaliada (MONTEIRO, 1984).

## 5. Resultados e Discussão

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1. Caracterização do *Zingiber zerumbet* e derivados

#### 5.1.1. Aspectos Morfológicos do Rizoma do Gengibre Amargo

Os rizomas de *Zingiber zerumbet* coletados no horto da CPPN apresentaram coloração marrom clara, formato irregular característico de tubérculos de gengibre e coloração amarelo pálida na parte inferior, visto através do corte transversal. Essas mesmas características foram reportadas por Srivastava et al. (2003), conforme Figura 12.



**Figura 11.** Tubérculo do gengibre amargo *Zingiber zerumbet* (*Zingiberaceae*) (A) e tubérculos em corte transversal (B).

Foto: Patrick Souza.

#### 5.1.2. Composição Físico-química do *Zingiber zerumbet*

A composição físico-química do *Zingiber zerumbet* está descrita na Tabela 1. Quanto à umidade foi observado um valor de 11,25 g/100g de amostra, valor relativamente baixo. O elevado teor de carboidratos com 75,79 g/100g é uma característica que indica a presença de açúcares. Os açúcares de baixo peso molecular podem, em condições apropriadas, servir como substrato para fermentação alcoólica (BOULTON; QUAIN, 2001).

O *Zingiber zerumbet* possui características interessantes para ser utilizado como adjunto do processo de elaboração do mosto cervejeiro. O teor de umidade pode, através de um processo simples de secagem, ser reduzido a valores mínimos, que facilitaria seu armazenamento por tempo maior em silos de matérias-primas. A redução da umidade dificulta o crescimento de microrganismos e deterioração desse produto (PINHEIRO, 2005).

**Tabela 1.** Composição físico-química do *Zingiber zerumbet*.

<b>Composição</b>	<b>Média</b>	<b>DP*</b>
Umidade (g/100g)	11,25	0,35
Cinza (g/100g)	4,05	0,07
Lipídeos (g/100g)	4,65	0,35
Proteínas (g/100g)	8,41	0,01
Fibra Total (g/100g)	7,11	0,01
Carboidratos (g/100g)	75,79	0,27
Valor Energético (kcal/100g)	378,63	2,08

\*DP = Desvio Padrão

O elevado teor de carboidratos é uma característica semelhante ao grão de malte de cevada, que deve ser submetido a processos de tratamento térmico, com ação de enzimas para que seja decomposto em cadeias de baixo peso molecular. Os vegetais são ricos em amido, que servem como fonte de armazenamento de energia reserva para esses seres vivos. Se incorporado à mostura pode apresentar o mesmo comportamento de degradação do amido do malte, diminuindo a complexidade do processo (VERSTREPEN et al, 2003).

O teor de proteínas de 8,41 g/100g se aproxima da concentração encontrada no malte de cevada, sendo encontrado entre 8 e 12 g/100g, que pode apresentar comportamento enzimático ou fonte de aminoácidos para os processos bioquímicos da fermentação (KOCK; RATLEDGE, 1993). O excesso de proteínas pode contribuir para formação de complexos químicos que podem gerar turvação da bebida, geralmente quando um aminoácido se liga a compostos fenólicos ou quando as proteínas possuem elevada quantidade de prolina que confere instabilidade estrutural as proteínas. As leveduras necessitam de aminoácido para completarem suas rotas metabólicas (JIBIKI et al, 2001; KREDER, 1999).

O teor de lipídios de 4,65 g/100g encontrado não chegou a interferir no comportamento das leveduras cervejeiras. Os lipídios são eliminados do processo cervejeiro ao término do cozimento do mosto, no descarte do trub quente, que é um aglomerado de proteínas de alto peso molecular, fibras e gorduras (KOCK et al, 2000). Quando em excesso pode se combinar com a

parede celular das leveduras cervejeiras, diminuindo a superfície de contato com o substrato e com isso dificultando o processo bioquímico de fermentação (STRAUSS et al, 2004).

Como explicado anteriormente as fibras são eliminadas juntamente com o trub quente, o *Zingiber zerumbet* apresentou 7,11 g/100g de fibras. O elevado teor de fibras também influencia na turvação da bebida, além de dificultar o processo de filtração. As fibras podem vedar os caminhos de filtração da cerveja no leito filtrante dentro de um filtro de terra infusória. O valor energético de 378 kcal/100 g foi impactado pela elevada concentração de carboidratos desse vegetal (YAMAGISHI; OGATA, 1999).

### 5.1.3. Composição de Minerais do *Zingiber zerumbet*

A composição de minerais do *Zingiber zerumbet* está expressa na Tabela 2. Os minerais são importantes para o processo bioquímico da fermentação, pois atuam como cofatores enzimáticos. Foi observado o elevado teor de cálcio, um metal que participa dos processos metabólicos da enzima alfa-amilase que tem importância significativa na degradação de amido na etapa de mostura. As amilases são enzimas cálcio dependentes.

**Tabela 2.** Composição de minerais do gengibre amargo.

Minerais	Média
Cálcio (Ca) (mg/100g)	44,82
Potássio (K) (mg/100g)	35,00
Ferro (Fe) (mg/100g)	5,09
Silício (Si) (mg/100g)	4,67
Manganês (Mn) (mg/100g)	3,90
Enxofre (S) (mg/100g)	2,99
Titânio (Ti) (mg/100g)	1,79
Fósforo (P) (mg/100g)	0,57
Zinco (Zn) (mg/100g)	0,47
Cobre (Cu) (mg/100g)	0,41
Rubídio (Rb) (mg/100g)	0,16
Estrôncio (Sr) (mg/100g)	0,11

Os minerais têm grande influência no ciclo de vida das leveduras cervejeiras. Com isso, a gestão de levedura na cervejaria é fundamental para a qualidade da cerveja e eficiência do processo. A integridade celular da levedura deve ser mantida durante a fermentação, no processamento da levedura e no produto acabado.

A *Zingiber zerumbet* apresentou elevado teor de potássio (K) de 35 mg/100g. Esse mineral é necessário na etapa aeróbica da fermentação, fase em que há elevada síntese de membranas plasmáticas que vão dar origem a novas células. O ferro (5,09 mg/100 g) estimula o ciclo de Krebs na via oxidativa e o cobre (0,41 mg/100 g) atua no crescimento celular .

A concentração de manganês de 3,90 mg/100g é considerada relativamente baixa, o que estimula o crescimento celular. Quando em excesso pode se tornar tóxico para as leveduras gerando autólise celular. A liberação de moléculas de grandes dimensões (por exemplo, enzimas proteolíticas) a partir de levedura tem um efeito prejudicial em várias características da cerveja, incluindo gosto, paladar, cor e espuma densa (PERPETE et al, 1996).

Estes efeitos normalmente são mediados, indiretamente, por meio da destruição de proteínas e polipeptídeos, com a concomitante liberação de peptídeos e aminoácidos. Os ácidos graxos livres liberados durante a autólise desestabilizam a espuma da cerveja, além de conferir sabores distintos para a mesma (MOCHABA et al, 1999).

#### **5.1.4. Rendimento do Óleo Essencial**

O rendimento médio encontrado a partir do processamento do rizoma em óleo essencial foi de 6,60 %. Valor semelhante foi encontrado por Pinheiro (2005) realizando estudo da qualidade de diferentes tipos de solo, para cultivo da *Z. zerumbet*, nesse estudo foi encontrado 6,90 % em um tratamento utilizando terra vegetal compostada e esterco de gado.

#### **5.1.5. Triagem Fitoquímica**

O *screening* fitoquímico revelou a presença dos compostos: xantonas, flavonoides, fenois e taninos (Tabela 3). No trabalho de Magalhães et al, (1997) e Leonel et al. (2005) o *screening* fitoquímico também revelou a presença de compostos alcaloides, flavonoides, taninos e fenois. No estudo de Iha et al.

(2008) foram encontrados flavonóides aromáticos no extrato metanólico tais como p-hidroxibenzaldeído, vanilina e caenferol.

**Tabela 3.** Prospecção fitoquímica dos extratos de *Zingiber zerumbet*.

<b>Substância</b>	<b>Extrato aquoso</b>	<b>Método</b>
Antocianinas	-	
Antocianidinas	-	
Xantonas	+	Teste Antocianinas, Antocianidinas e flavonoides.
Chalconas	-	
Auronas	-	
Flavonóides	+	
Fenóis	+	Teste FeCl <sub>3</sub>
Taninos	+	Teste FeCl <sub>3</sub>
Alcaloides	-	Teste de Dragendoff e Meyer

A produção desses compostos, em condições controladas de fermentação, garante um material de qualidade. A grande diversidade de estruturas químicas capaz de ser elaborada pelos microrganismos possibilita a obtenção de polímeros hidrossolúveis com diferentes propriedades. Esse grupo de polissacarídeos solúveis em água, de origem vegetal, animal ou microbiológica, é conhecido como goma industrial (FONTANIELLA et al, 2002; LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009).

Os flavonoides protegem o organismo do dano produzido por agentes oxidantes como os raios ultravioleta, poluição ambiental, substâncias químicas presentes nos alimentos, estresses, dentre outros. O organismo humano não produz essas substâncias químicas protetoras, cabendo ao homem obtê-las por meio da alimentação (SGARBIERI VC; PACHECO, 1999).

Suas propriedades biológicas estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada fenol exerce sobre determinado meio. A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (MAMEDE;

PASTORE, 2004). Pearson et al. (1999) demonstraram que os fenólicos presentes em suco comercial e extrato fresco de maçãs inibiram, in vitro, a oxidação de LDL humana.

O grupo de compostos flavonóides, do qual fazem parte os taninos, possuem uma estrutura básica, C6 -C3 -C6, que inclui os mais diversos e numerosos compostos fenólicos de plantas: pigmentos antocianinas, flavonas, flavonóis, flavanonas e alguns menos conhecidos como auronas, chalconas e isoflavonas (DESHPANDE et al., 1986; IHA et al, 2008).

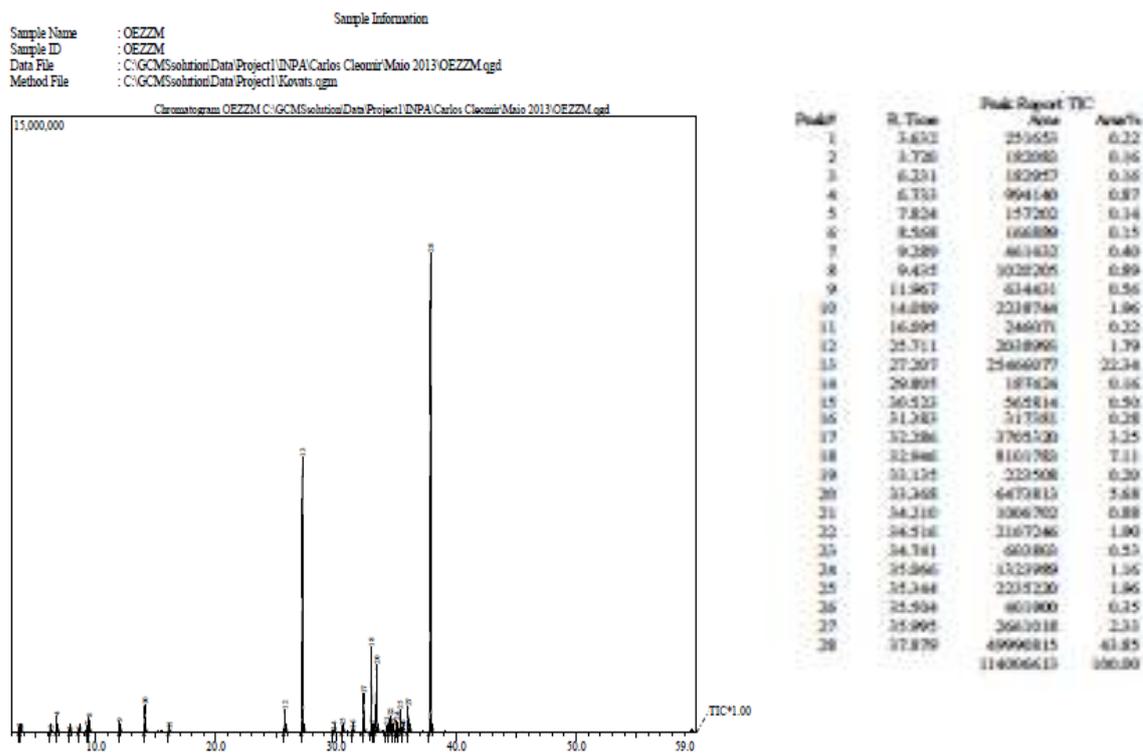
Fenóis comuns em plantas não são considerados tóxicos em quantidades e condições normais, com exceção dos fenóis poliméricos denominados taninos, que possuem a habilidade de complexar e precipitar proteínas de soluções aquosas (SALUNKHE et al., 1990).

Taninos são compostos fenólicos solúveis em água, com peso molecular entre 500 e 3000 e habilidade para precipitar proteína. Os taninos são compostos de alto peso molecular, que contêm suficientes grupos hidroxila fenólica, para permitir a formação de ligações cruzadas estáveis com proteínas (SARKAR; HOWARTH, 1976).

Quando combinados com as proteínas solúveis da cerveja, os taninos formam complexos que aumentam a turbidez dificultam o processo de filtração. Os complexos obstruem os canais preferenciais de filtração formados pela terra infusória no interior do filtro, aumentando o diferencial de pressão e impedindo a filtração (KUNZE, 2009).

#### **5.1.6. Cromatografia Gasosa do Rizoma**

A Figura 13 apresenta o cromatograma que comprova a presença do composto zerumbona no rizoma de *Zingiber zerumbet*, respresentado pelo maior pico com cerca de 44 %. Esse composto apresenta propriedades biológicas, tais como hepato proteção, antiulcera, antitumoríferos, citotóxico e antibacteriano (MATTHES et al, 1980; DAÍ et al, 1997; FUJIMOTO et al, 1998).



**Figura 12.** Cromatografia gasosa do rizoma de *Zingiber zerumbet* com marcação do composto zerumbona em evidência.

## 5.2. Avaliação Qualitativa dos Grãos de Malte

Os maltes utilizados no presente estudo apresentaram aroma típico, checado através do teste do chá, por meio o qual não foram observadas características prejudiciais como aroma e odor de fumaça, mofo, metálico, óleo, entre outros.

Não apresentaram parasitas vivos, que poderiam consumir o interior do grão prejudicando no rendimento do extrato (LINKO et al., 1998); e o aspecto morfológico foi típico, ou seja, não haviam grãos quebrados (Figura 14). Os resultados estão expressos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Avaliação dos maltes de cevada.

Avaliação	Malte de Cevada
Teste do Chá	Típico
Parasita Vivo	Ausente
Aspecto Morfológico	Típico

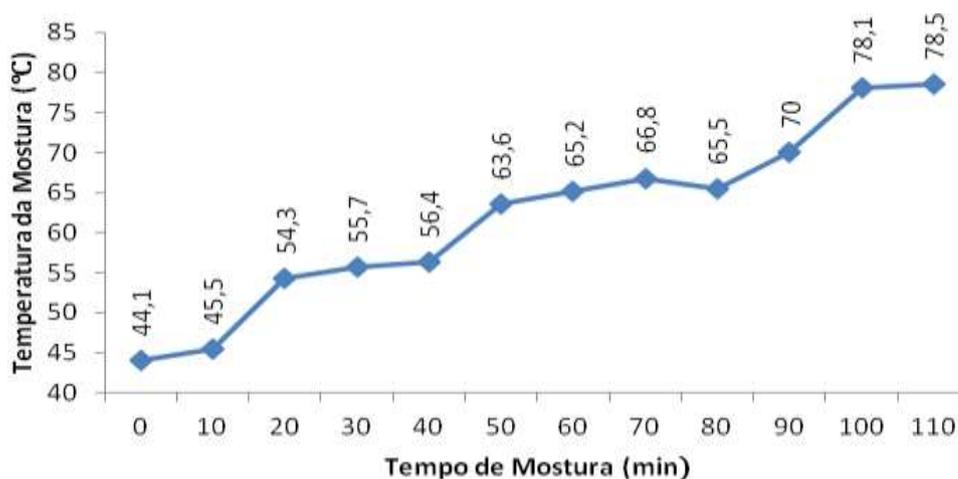


**Figura 13.** Aspecto morfológico do malte Agromalte.

Foto: Patrick Souza.

### 5.3. Elaboração do Mosto Cervejeiro

O resultado da curva de mostura obtida está representado no Gráfico 1. Os resultados evidenciam que não houve alteração fora da faixa desejada de temperatura durante esse processo. Este resultado foi satisfatório pois qualquer alteração significativa pode interferir na conformação das enzimas causando sua desnaturação e inativação, afetando a sua função catalítica (CARVALHO et al., 2006).



**Gráfico 1.** Curva de mostura com rampas de temperatura em função do tempo.

Após a última etapa da mostura foi realizado o teste com iodo, o resultado foi negativo para presença de açúcares de alto peso molecular, comprovando a eficiência do processo de mosturação. O aspecto visual da mostura pode ser visto na Figura 15.



**Figura 14.** Aspecto visual do início da mostura.

Foto: Patrick Souza.

Após a etapa de filtração, o mosto foi separado do bagaço (Figura 16). O bagaço da cerveja é rico em palha de malte e substâncias indesejáveis para o produto final. Quando não separadas de forma adequada, podem causar alteração de sabor como adstringência e palha. Além de conter taninos e proteínas ricas em prolina que causam turvação da cerveja após envase.



**Figura 15.** Bagaço retido após a etapa de filtração do mosto.

Foto: Patrick Souza.

Após a fervura, o mosto foi deixado em descanso para que o trub (Figura 17), mistura de proteínas, lipídeos e outros compostos insolúveis se aglomerassem e decantassem. A cerveja foi trasfegada para um biorreator, após o processo de decantação, onde foi resfriada para posterior inoculação. O trub exerce um efeito físico, proporcionando locais de aglomeração de bolhas de gás carbônico, que podem contribuir mantendo as células de levedura em suspensão por tempos mais longos (KREDER, 1999).

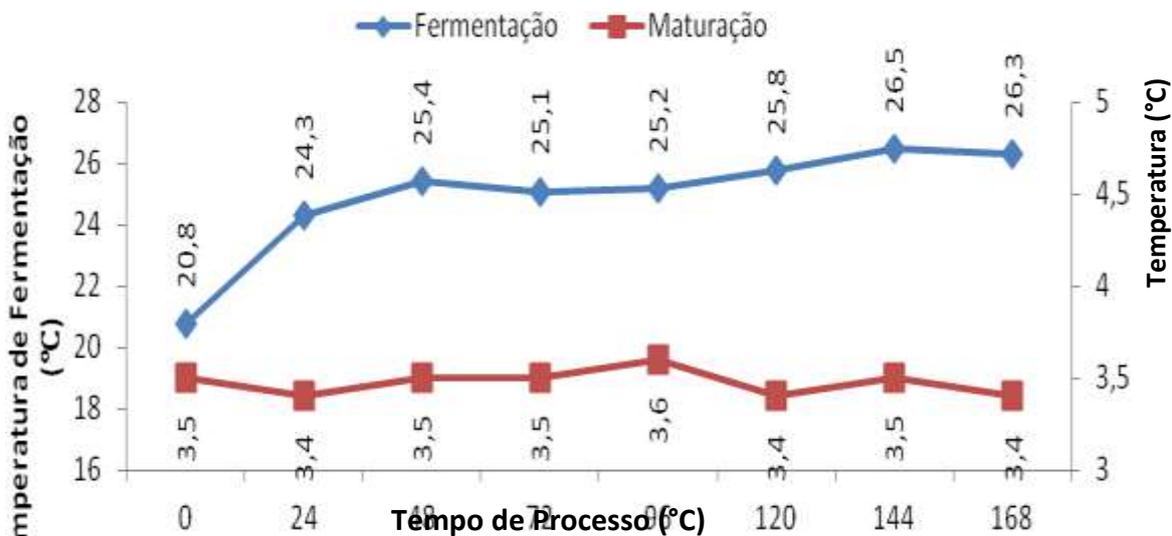


**Figura 16.** Trub em processo de formação após a fervura.

Foto: Patrick Souza.

#### **5.4. Fermentação e Maturação da Cerveja**

A fermentação iniciou com temperatura de 20,8 °C no biorreator com processo usando leveduras na forma livre, ou seja, em contato direto com o mosto cervejeiro. Todo o processo de fermentação aconteceu com temperaturas entre 18 – 25 °C, por um período de 7 dias, onde houve estabilização na produção de gás carbônico, redução do extrato aparente final e teor alcoólico. O acompanhamento da temperatura de fermentação e maturação foi reportado no Gráfico 2.

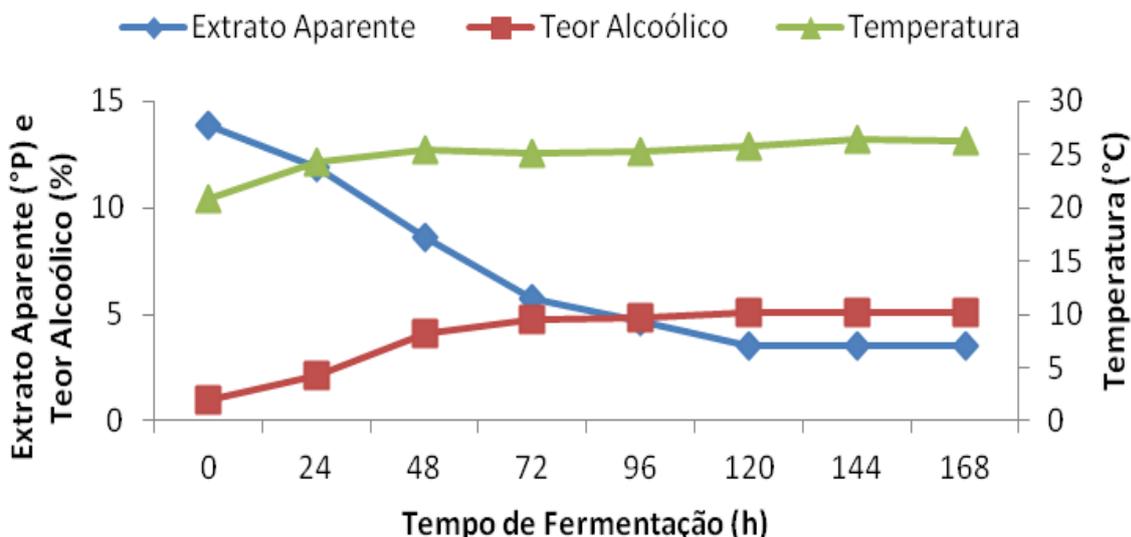


**Gráfico 2.** Rampa de temperatura de fermentação e maturação da cerveja.

Durante a fermentação a temperatura teve leve oscilação, porém não houve choque térmico. O choque térmico pode influenciar negativamente na dinâmica da fermentação da cerveja. Após o término da fermentação as leveduras flocularam e foram separadas da cerveja, que foi trasfegada para outro biorreator. Em seguida, a bebida foi maturada e adicionada de óleo essencial de gengibre amargo para evitar o contato com as leveduras e possível interferência no processo de fermentação. A maturação foi conduzida a temperatura média de 3,5 °C por 168h.

Após 96 horas, atingiu valor próximo de 60 % de fermentabilidade. Souza (2010) encontrou resultado semelhante por volta do segundo dia de processo em um sistema semelhante, caracterizando uma fermentação mais rápida do que a cerveja em teste.

O valor relacionado a redução do extrato e produção de etanol em função do tempo com controle de temperatura está apresentado no Gráfico 3. Ao longo do processo fermentativo do mosto observou-se o comportamento inversamente proporcional entre o extrato aparente e o teor alcoólico da cerveja em fermentação. Após 120 horas de fermentação, observou-se uma maior estabilidade entre os compostos avaliados, com valores finais de etanol de 5,11 % (v/v) e extrato aparente de 3,56 °P.



**Gráfico 3.** Variáveis do processo relacionadas à temperatura, extrato aparente e teor alcoólico em função do tempo.

O valor obtido para o teor alcoólico está dentro dos padrões estabelecidos na legislação brasileira reportada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) que determina para cervejas um teor alcoólico máximo de 8 % v/v.

### 5.5. Contagem de Células Vivas

Após a retirada das leveduras foram observadas que 86% das células estavam vivas. Segundo Carvalho et al. (2006), valores abaixo de 90% podem impactar no tempo de fermentação. Esse dado não significa que as leveduras não podem ser reutilizadas em novos processos fermentativos, pois tendem a retardar esse processo.

### 5.6. Caracterização da Cerveja

Os resultados físico-químicos da cerveja artesanal produzida com gengibre amargo estão expressos na Tabela 5.

**Tabela 5.** Composição físico-química da cerveja artesanal com gengibre amargo.

<b>Físico-química</b>	<b>Cerveja Artesanal</b>
Extrato Original (°P)	12,18 ± 0,07
Extrato Aparente (°P)	2,94 ± 0,04
Teor Alcoólico (% v/v)	4,94 ± 0,02
pH	4,63 ± 0,01
Gás Carbônico (% p/p)	0,38 ± 0,05
Cor (EBC)	10,03 ± 0,15
Amargor (BU)	39,20 ± 0,26
Turvação 24 horas (EBC)	2,67 ± 0,19
Dicetonas (mg.L <sup>-1</sup> )	0,31 ± 0,03
Zerumbona (mAU)	0,53 ± 0,01

A cor da cerveja apresentou 10,03 EBC, que de acordo com a legislação estabelecida pelo MAPA pode ser classificada como cerveja clara, por apresentar valor assegurado abaixo de 20 EBC. Os autores Curi et al. (2008) e Souza (2010) produziram cervejas claras com valores abaixo de 8 EBC, utilizando adjuntos semelhantes.

A coloração da cerveja pode ser influenciada por fatores como o elevado tempo de fervura que pode formar melanoidinas e com isso escurecer o mosto; pode ser influenciada pela matéria-prima, quando utiliza maltes escuros ou com menor quantidade de sêmulas (SOUZA, 2010). No entanto, a cerveja produzida não teve essa influência.

O resultado de amargor encontrado na cerveja foi 39,20 BU, número que foi maior em 2,4 BU do que o planejado com lúpulo comum. Essa influência pode ter sido causada pelo amargor contido no óleo essencial do gengibre amargo, o que pode ser uma descoberta importante uma vez que o gengibre pode servir como substituto de parte do lúpulo.

Venturini filho et al. (1998) encontraram valores de amargor próximos, 10,8 e 11 EBC analisando cervejas com hidrolisado de milho e hidrolisado de mandioca, respectivamente; Curi et al. (2008) estudando cerveja puro malte encontrou resultados de amargor de 11,5 EBC. O amargor da bebida é determinado pelo cervejeiro no momento da elaboração da receita.

A principal fonte de amargor para a cerveja é o lúpulo. Para uma mesma concentração de iso- $\alpha$ -ácidos, o amargor pode ser diferente para cada bebida, dependendo da concentração dos isômeros *cis* e *trans*. Estes contribuem com proporções diferentes para o amargor da cerveja e sua formação depende das condições de isomerização dos iso- $\alpha$ -ácidos, ocorrida durante a fermentação do mosto (TECHAKRIENGKRAIL et al, 2004)

O gás carbônico (CO<sub>2</sub>) produzido durante a fermentação do extrato é suficiente para provocar a carbonatação da cerveja durante a maturação (CARVALHO et al, 2006). A cerveja elaborada apresentou média de 0,38 % p/p de CO<sub>2</sub> um resultado baixo quando comparado com cervejas do mercado que apresentam cerca de 0,5 %. O elevado teor de CO<sub>2</sub> confere frescor a cerveja.

A cerveja apresentou pH de 4,63, valores próximos foram encontrados por Curi et al. (2008) estudando cerveja de malte e maltose de milho, com pH de 4,5 e 4,71. A análise de turvação apresentou valor elevado de 2,67, típico de cervejas filtradas de modo artesanal. A turvação em cerveja está relacionada principalmente a quantidade de células remanescente do processo após a retirada do fermento.

Valores acima de 1 EBC podem ocasionar sedimentação de proteínas na cerveja. Este fato geralmente ocorre após 6 meses de armazenamento em prateleira, ou após sucessivas práticas de congelamento e descongelamento do produto.

O valor de dicetonas obtido na cerveja foi da ordem de 31 ppb, o limite de detecção sensorial do diacetil pelos consumidores é de 20 ppb (LINKO et al., 1998). O teor alcoólico foi de 4,96 % v/v, Souza (2010) encontrou cervejas com resultados inferiores 4,34 e 4,21 % v/v. Este valor pode ser considerado como moderado quando comparado com o de outras bebidas alcoólicas fermentadas, como o vinho, por exemplo.

A cerveja apresentou 0,53 mUA de zerumbona que comprova que o composto foi preservado até o apronte do produto acabado, não sendo eliminado do meio após o processo cervejeiro. A zerumbona não prejudicou o processo de fermentação da bebida que comprova que sua incorporação na cerveja é viável.

De acordo com o Decreto N°6871 de 04 de junho de 2009 que regulamenta a Lei N° 8.918 de 14 de julho de 1994 do MAPA (BRASIL, 2009) que define parametrização de cervejas, quando o extrato original da cerveja encontra-se entre 12 e 14 °P, a cerveja é classificada como “cerveja extra”, quanto a cor é considerada uma cerveja clara, alcoólica, quanto a proporção de malte, “cerveja”, de baixa fermentação.

### 5.7. Variáveis de Resposta do Bioprocesso

As variáveis de resposta do bioprocessamento estão descritas na Tabela 6. O processo apresentou rendimento de células ( $Y_{X/S}$ ) de  $0,322 \text{ g.g}^{-1}$  e taxa específica de crescimento celular ( $\mu_X$ ) de 0,012. Esses valores são superiores a cerveja produzida por Souza (2010) que utilizou farinha de pupunha na elaboração da bebida.

Segundo Façanha (1998) a produtividade volumétrica ( $Q_p$ ), o fator de rendimento de produção de etanol ( $Y_{P/S}$ ) e a eficiência fermentativa ( $E_f$ ) são os fatores de maior importância para o planejamento técnico da fermentação, pois evidenciam a velocidade de síntese do produto. Carvalho (2007) estudando elaboração de cerveja com adjunto a  $12^\circ\text{P}$ , encontrou  $Y_{P/S}$  de  $0,45 \text{ g.g}^{-1}$ .

**Tabela 6.** Variáveis de resposta dos bioprocessos de elaboração da cerveja.

Variáveis	Livre
( $Y_{X/S}$ ) Rendimento de Células em Relação ao Substrato ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,322
( $Q_p$ ) Produtividade Volumétrica ( $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ )	0,061
( $Y_{P/S}$ ) Rendimento de Produção de Etanol ( $\text{g.g}^{-1}$ )	0,477
(EF) Eficiência Fermentativa (%)	88,45

A cerveja apresentou 88,45% de eficiência fermentativa o que representa o bom desempenho do processo de fermentação pelas leveduras cervejeiras, realizando a conversão dos açúcares em álcool, gás carbônico e outros metabólitos secundários.

### 5.8. Avaliação Microbiológica

Os resultados microbiológicos da cerveja produzida, mostraram que o processo artesanal é suscetível à contaminação por microrganismos oportunistas. Antes do processo de pasteurização, a cerveja artesanal apresentou 84 UFC.mL<sup>-1</sup> de bactérias Gram-negativas, 9 UFC.mL<sup>-1</sup> de leveduras selvagens, oriundas do ambiente e/ou da parede do vegetal utilizado, e nenhuma colônia de bactérias lácteas, conforme Tabela 7.

Todos esses microrganismos foram eliminados após o processo de pasteurização da cerveja artesanal, mostrando que esse processo foi eficiente, conforme Tabela 8. Quando presentes na cerveja podem alterar seu sabor e aroma.

**Tabela 7.** Avaliação microbiológica antes do processo de pasteurização da cerveja artesanal com gengibre amargo.

Característica	Contagem
Contagem Total de Bactérias Lácticas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Ausente
Contagem de Bactérias Gram-negativas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	14
Contagem de Leveduras Selvagens (UFC.mL <sup>-1</sup> )	9

**Tabela 8.** Avaliação microbiológica após o processo de pasteurização da cerveja artesanal com gengibre amargo.

Característica	Contagem
Contagem Total de Bactérias Lácticas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Ausente
Contagem de Bactérias Gram-negativas (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Ausente
Contagem de Leveduras Selvagens (UFC.mL <sup>-1</sup> )	Ausente

A pasteurização consiste no aquecimento do produto com tempo e temperatura controlados, visando eliminar bactérias patogênicas e reduzir as deterioradoras, seguido de resfriamento, aumentando a vida da bebida (VENTURINI et al., 2007).

### **5.9. Descritivo Sensorial**

A cerveja artesanal utilizando *Zingiber zerumbet* apresentou, no aspecto visual, cor clara, espuma baixa de coloração branca e leve turbidez característica de cervejas artesanais.

Quanto ao aroma apresentou aroma característico de malte, com notas de etanoato de etila e traços de gengibre. Apresentou sabor leve adstringência e amargor moderado com remanescência no final da língua.

## 6. Conclusão

## **6. CONCLUSÃO**

### **6.1. Composição química do rizoma de gengibre amargo.**

- O rizoma apresentou qualidade físico-química que permitiu sua utilização como adjunto no processo cervejeiro, não interrompendo ou atrasando o tempo de fermentação.
- O rizoma apresentou o principal constituinte de interesse a zerumbona, conforme análises do CG.
- Apesar de conter polifenóis e taninos, esses compostos não interferiram na filtração da cerveja artesanal. Porém serão necessários estudos em plantas piloto para avaliação da interferência na turbidez e vazão de filtração em filtro de terra infusória,

### **6.2. Elaboração da cerveja artesanal por meio de processo fermentativo em batelada com leveduras livres.**

- As melhores etapas de processo para utilização do rizoma foram: extrato na mostura e óleo essencial na maturação. Para utilização em escala industrial será necessário avaliar o processo em planta piloto.

### **6.3. Análise fitoquímica do óleo essencial do gengibre e da cerveja artesanal obtida.**

- Foram encontrados os compostos de interesse com propriedades terapêuticas no gengibre e óleo essencial. Em destaque, foi observada a presença da zerumbona, composto de maior interesse do estudo.
- A cerveja apresentou o composto zerumbona sem que o processo fosse prejudicado o que demonstra que esse produto pode apresentar possíveis atividades terapêuticas,

### **6.4. Monitoramento do processo fermentativo por meio de análises físico-químicas.**

- Os processos apresentaram comportamento de fermentação dentro do esperado, não houve alteração físico-química significativa com a utilização do *Zingiber zerumbet*.

### **6.5. Avaliação das características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais da cerveja.**

- A cerveja apresentou características físico-químicas semelhantes a cerveja comum, destacando-se a qualidade microbiológica garantida pela pasteurização, compostos do lúpulo e provavelmente do rizoma de gengibre amargo.
- A cerveja apresentou características sensoriais com sabor e aromas perceptíveis, destacando o amargor originado do gengibre.

### **6.6. Avaliação do potencial biotecnológico da utilização do rizoma de *Zingiber zerumbet* como adjunto na produção de cerveja artesanal.**

- O gengibre amargo apresentou características que permitem sua utilização como adjunto no processo cervejeiro, pois não interferiu no processo de elaboração da cerveja, além de conferir qualidade à bebida.

## 7. Referências

## 7. REFERÊNCIAS

ABDUL, A.B.; ABDELWAHAB, S.I.; AL-ZUBAIRI, A.S.; ELHASSAN, M.M.; MURALI, S.M. Anticancer and antimicrobial activities of zerumbone from the rhizomes of *Zingiber zerumbet*. Int J Pharmacol: v.4, pp301-304, 2008.

ANDRADE, C. M. **Obtenção de chope utilizando arroz preto (*Oryza sativa*) como adjunto de malte**. Lorena: 2007. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo.

ALMEIDA E SILVA, J. B. **Cerveja**. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.) **Tecnologia de Bebidas**. 1. ed. São Paulo: Edgar Blücher, 2005.

AMBEV. **Apostilas do Curso Profissional Cervejeiro**. Jacareí: AMBEV, 2011

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS-AOAC. **Official methods of analysis**. 16. ed. Washington, 1998.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. (Ed.) **Biotecnologia na produção de alimentos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001.

BRASIL. Decreto Lei (2009). **Ministério da Agricultura e do Abastecimento: Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas e autoriza a criação da Comissão Intersetorial de bebidas e dá outras providências**. Brasília, DF: Senado, 1997.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2001.

BUCKER, A.; FALCAO-BUCKER, N.C.; NUNZ, C.V.; PINHEIRO, C.C.S.; TADEI, W.P. Evaluation of larvicidal activity and brine shrimp toxicity of rhizome extracts of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. Uberaba: v.46, n.3, pp9, may/June, 2013.

CARVALHO, G.B.M.; BENTO, C.V.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro. 1º parte: As Leveduras. Revista Analítica. [s.l], n.25, pp36-42, 2006.

CARVALHO, G.B.M.; ROSSI, A.A.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro. 2º parte: A Fermentação. Revista Analítica. [s.l.], n.26, pp46-54, 2007.

CASEMIRO, I.P.; RAMOS, P. Produção científica sobre alimentos funcionais: uma análise das publicações brasileiras entre 2007 e 2013. Revista Demetra. [s.l.], v.9, n.4, pp925-941, 2014.

CIOLFI, F. **Potencial antimicrobiano de extratos e óleos vegetais não tradicionais sobre patógeno de origem alimentar.** Viçosa: 2010. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa.

COLLA, L.M.; MORAES, F.P. Alimentos Funcionais e Nutraceuticos: Definições, Legislação e Benefícios à Saúde. Revista Eletrônica de Farmácia. [s.l.], v.3, n.2, pp109-122, 2006.

CLUBBER. Mercado de Cerveja Artesanal. Clubber. [s.l.]. 30 de jan de 2015. Disponível em: <http://www.clubeer.com.br/blog/historia-brasileira-e-cervejaria-cervejas-artesanais>. Acessado em: 30/01/2015.

CURI, R.A.; VENTURINI FILHO, W.G.; DUCATTI, C.; NOJIMOTO, T. Produção de cerveja utilizando cevada e maltose de milho como adjunto de malte: análises físico-química, sensorial e isotópica. Braz. Journal Food Technology. [s.l.], v.11, n.4, pp279-287, 2008.

DAI, J.R.; CARDELLINA II, J.H.; MCMAHON, J.B.; BOYD, M.R. Zerumbone, an HIV-inhibitory and cytotoxic sesquiterpene of *Zingiber aromaticum* and *Z. zerumbet*. Natural Product Letter, v.10, pp115-118, 1997.

DE ANGELIS, R. C. **Fisiologia da nutrição: fundamentos para nutrição e desnutrição.** 1. ed. São Paulo: EDART, 1977.

DESHPANDE , S. S.; CHERYAN, M.; SALUNKHE, D. K. Tannin analysis of food products. CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition. Boca Raton, v.24, n.4, pp01-449, 1986.

DRAGONE, G.; MUSSATO, S.I.; ALMEIDA E SILVA, J.B. Inovações na produção de cerveja: fermentação contínua utilizando leveduras imobilizadas em suporte natural obtido a partir do bagaço de malte. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, n. 35, 2007.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, J. B. **Cerveja**. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.) **Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Blucher, 2010. Cap 1, pp15-50.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION - EBC. **Analytica**. 4. Ed. Zurich: Brauerei, 1987.

FONTANIELLA, B.; RODRÍGUES, C.W.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M.-E. Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. *Journal of Chromatography B*, n.770, pp275-281, 2002.

FUJIMOTO, V.; MARUNO, K.; MADE, S. Antitumour sesquiterpene extraction from ginger roots. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho*, 6pp, patent No-JP 01221344 Az. 1998.

HAMPSON, T. **O Livro da Cerveja**. ed. São Paulo: Globo Estilos, 2014.

HUANG, G.G.C.; CHIEN, T.Y.; CHEN, L.G.; WANG, C.C. Antitumour effects of Zerumbone from *Zingiber zerumbet* in P-388D1 cells in vitro and vivo. *Planta Medica*, [s.l.], n.71, pp219-224, 2005.

HUGHES, P. The significance of iso-alfa-acids for beer quality Cambridge prize paper. *Journal of the Institut of Brewing*. [s.l.], v.106, n.5, pp271-276, 2000.

IHA, S. M.; MIGLIATO, K. F.; VELLOSA, J. C. R.; SACRAMENTO, L. V. S.; PIETRO, R. C. L. R.; ISAAC, V. L. B.; BRUNETTI, I. L.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. [s.l.], v.18, n.3, pp387-393, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análises de alimentos**. 4. ed. São Paulo: IMESP, 2008.

JIBIKI, M.; ISHIBIKI, T.; YUUKI, T.; KAGAMI, N. Application of Polymerase Chain Reaction to Determine the Flocculation Properties of Brewer's Lager Yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* [s.l.], v.59. n.3, pp107-110, 2001.

KEUKELEIRE, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova.* [s.l.], v.23, n.1, pp108-112, 2000.

KOCK, J.L.F.; RATLEDGE, C. Changes in lipid composition and arachidonic acid lipid turnover during the life cycle of the yeast *Dipodascopsis uninucleata*. *J. Gen. Microbiol.* [s.l.], v.139, pp459–464, 1993.

KOCK, J. L. F.; VENTER, P.; SMITH, D. P.; VAN WYK, P. W. J.; BOTES, P. J.; COETZEE, D. J.; POHL, C. H.; BOTHA, A.; RIEDEL, K. H.; NIGAM, S. A novel oxylipin-associated 'ghosting' phenomenon. *Ant. v. Leeuwenhoek*, v.77, pp401–406, 2000.

KREDER, G.C. Yeast Assimilation of Trub-Bound Zinc. Brewing Technical Services, Anheuser-Busch Inc. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* [s.l.], v.57, n.4, pp129-132, 1999.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. International Edition. Berlin: VLB, 2009.

LEONEL, M.; SARMENTO, S.; FERRARI, B. Aproveitamento do gengibre (*Zingiber officinale*) de qualidade inferior como matéria-prima amilácea. *Revista Raízes e Amidos Tropicais*. Botucatu, v.1, pp9-18, 2005.

LINKO, M; HAIKARA, A; RITALA, A.; PENTTILÄ, M. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology.* [s.l.], v.65, pp85-98, 1998. .

LUVIELMO, M.M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicação. *Estudos tecnológicos.* [s.l.], v. 5, n.1, pp50-67, 2009.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J. M. **Manual de Indústrias de alimentos**. 1. ed. São Paulo: Varela, 1996.

MAGALHÃES, M. T.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; CORNEJO, F. E. P.; MARQUES, L. M. R. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) Brasileiro: Aspectos Gerais, Óleo Essencial e Oleoresina. Parte 2 – Secagem, Óleo Essencial e Oleoresina. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v.17, n.1, pp132-136, 1997.

MAMEDE, M.E.O.; PASTORE, G.M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. B CEPPA, v.22, n.2, pp233-252, 2004.

MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 3. Ed. Fortaleza: UFC,2009.

MATTHES, H.W.D.; LUU, B.; OURISSON, G. Chemistry and Biochemistry of Chinese drugs. Part VI. Cytotoxic components of *Zingiber zerumbet*, *Curcuma zedoaria* and *Curcuma domestica*. Phytochemistry. [s.l.], v.19, pp2643-2650, 1980.

MOCHABA, F. M.; TORLINE, P. A.; VUNDLA, W.; HULSE, G.; AXCELL, B.C. Slurry pH as an indicator of yeast autolysis. Proc. Conv. Inst.Brew. Africa Sect, v.7, pp205-207, 1999.

MONTEIRO, C. L. B. **Técnicas de avaliação sensorial**. 2. ed. Curitiba: CEPPA, 1984.

MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. Ed. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009.

MORAES, S. A.; ALVES, S. B. **Quantificação de inóculo de patógenos de insetos**. In ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manolo, 1986. cap. 14, pp278-288.

MURAKAMI, A.; TAKAHASHI, M.; JIWAJINDA, S.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Identification of zerumbone in *Zingiber zerumbet* Smith as a potent inhibitor of 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate-induced Epstein-Barr virus activation. Biosci Biotechnol Biochem, v.63, pp1811-1812, 1999.

NAG, A; BANDYOPADHYAY, M; MUKEHERJEE, A. Antioxidant activities and cytotoxicity of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith rhizome. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry. AkiNik Publications, v.2, n.3, pp102-108, 2013.

NAKANO, V.M. Teoria da Fermentação e Maturação. In: WORKSHOP ADEGAS, 1, 2000, Brasília. Anais. Brasília: AMBEV, 2000.

NOONAN, G. J. **New brewing lager beer**. Ed. Boulder: Brewers Publications, 1996.

OLIVEIRA, H.S.; CARDOSO, P.R. O marketing dos alimentos funcionais: reflexões sobre o mercado e os consumidores. **Biblioteca on-Line de Ciências da Comunicação**. [s.l.] 2010. Disponível em: <http://www.bocc.ubi.pt/pag/bocc-cardoso-marketing.pdf>. Acessado em: 01 de fev de 2015.

OLIVEIRA, N. A. M. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. Minas Gerais; 2011. 45 f. Monografia (Especialização em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Universidade Federal de Minas Gerais.

PEARSON, D.A.; TAN, C.H.; GERMAN, J.B.; DAVIS, P.A.; GERSHWIN, M.E. Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sci*, v.64, n.21, pp1913-1920, 1999.

PERPETE, P.; MAUDOUX, M.; DEVREUX, A.; COLLIN, S. Proteinase A secretion by yeast. *Proc. J. de Clerk Chair VIII*, pp. 36-42, 1996.

PINHEIRO, C. C. S. **Estudo químico e farmacológico das raízes de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (*Zingiberaceae*), cultivada em Manaus**. Manaus, 2005. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, v.34, n.2, pp105-110, 2002.

RODRIGUES, P. A. **Plano de Negócios de uma Microcervejaria Artesanal na Cidade de Porto Alegre**. Porto Alegre: 2010. 122 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Administração) - Departamento de Ciências Administrativas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SALUNKHE, D. K.; CHAVAN, J. K., KADAM, S. S. **Dietary tannins: consequences and remedies**. Ed. Boca Raton: CRC Press, 1990.

SARKAR, S.K., HOWARTH, R.E. Specificity of vanillin test for flavanols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. Washington DC, v.24, n.12, pp317-320, 1976.

SENAI. **Apostilas do curso técnico cervejeiro**. Vassouras: SENAI, 1997

SGARBIERI VC, PACHECO MTB. Revisão: alimentos funcionais fisiológicos. *Braz J Food Technol*. [s.l.], v.2, n1-2, pp7-19, 1999.

SILVA, N; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análises microbiológicas de alimentos**. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 1997.

SIMPSON, W. J.; SMITH, A. R. W. Factors affecting antibacterial activity of hops compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology*. [s.l.], v.72, n.4, pp 327-334, 1992.

SOUZA, M. V. A.; LANG, R. A. S. **Plano de Negócios de uma Cervejaria Artesanal na Cidade do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: 2014. 71 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia de Produção) - Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

SOUZA, P. G. **Obtenção de cervejas tipo lager com uso de farinha de pupunha (*Bactris gasipaes* Kunth) como adjunto e bioprocessado conduzido com leveduras livres e imobilizadas**. Manaus: 2010. 117 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia) - Universidade do Estado do Amazonas.

SRIVASTAVA, S.; MEHROTRA, S.; RAWAT, A. Pharmacognostic evaluation of the rhizomes of *Curcuma zedoaria* Rosc. *Pharmacognosy Journal*. [s.l.], v.3, pp20-25, 2003.

STRAUSS, C.J.; KOCK, J.L.F.; VILJOEN, B.C.; BOTES, P.J.; HULSE, G.; LODOLO, E. Lipid Turnover During Inverse Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* UOFS Y-2330. *J. Inst. Brew.* [s.l.], v.110, n.3, pp207–212, 2004.

TECHAKRIENGKRAIL, I. Relationships of sensory bitterness in lager beer to iso-alpha-acid contents. *Journal of the Institut of Brewing*. [s.l.], v.110, n.1, pp51-56, 2004.

VENTURINI, K.S.; SARCANELLI, M.F.; SILVA, L.C. Processamento do leite. *Boletim Técnico*, PIE-UFES:02207, Editado: 19.10.2007. Universidade Federal do Espírito Santo. 7p.

VENTURINI FILHO, W.G.; CEREDA, M.P. Hidrolisado de fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja: avaliação química e sensorial. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* [s.l.], v.18, n.2, 1998.

VENTURINI FILHO, W. G. **Qualidade da cerveja**. In: VENTURINI FILHO, W. G. (Org.) **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: Funep, 2000. Cap 3, pp8-22.

VERSTREPEN, K.J.; DERDELINCJX, G.; VERACHERT, H.; DELVAUX, F.R. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* [s.l.], v.61, pp197–205, 2003.

YAMAGISHI, H.; OGATA, T. Chromosomal structures of bottom fermenting yeasts. *System. Appl. Microbiol.*[s.l.], v.22, pp341-353, 1999.

YOB, N.J.; JOFRY, S.M.; AFFANDI, M.M.R.M.M.; TEH, L.K.; SALLEH, M.Z.; ZAKARIA, Z.A. *Zingiber zerumbet* (L.) Smith: A Review of Its Ethnomedicinal, Chemical, and Pharmacological Uses. *Evid Based Complement Alternat Med.* [s.l.], pp1-2, 2011.