

Produção de cervejas com baixo teor de glúten por co-fermentação com bactérias lácticas

Mariana Gracias Coelho de Sousa

Dissertação para a obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Alimentar

Orientadores: Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista

Doutora Marisa Andreia Viegas Ventura dos Santos

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Louro Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Manuel José de Carvalho Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com Agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professor auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa, orientadora

Agradecimentos

Para quem é adepta da expressão “Obrigada, fui eu que fiz!”, terei de admitir que é verdade, mas só é verdade porque estou rodeada de pessoas fantásticas.

Desta forma, começo por agradecer em primeiro lugar à minha orientadora Professora Catarina Prista por inicialmente me ter ajudado a escolher o tema dissertação com a qual me identificasse, por me ter acolhido e partilhado a “Casinha”, tornando num espaço que também foi meu, pela disponibilidade inabalável em ajudar-me a crescer a nível técnico e pessoal e por ser um modelo profissional digno de grande admiração. À minha orientadora Marisa Santos, por se ter juntado mais tarde e oficialmente como minha orientadora nesta grande aventura, sendo que me guiou desde o início na componente prática, teórica ou pessoal, na medida de ganhar confiança para pedir ajuda e a tirar dúvidas.

Aos meus colegas que partilharam o espaço “Casinha” comigo: Rafaela, Leandro e Sara, que me proporcionaram um bom ambiente de trabalho e companheirismo!

Mais uma vez agradeço à Sara, não só por ser um “agregado familiar” da “Casinha”, mas por ter sido uma excelente colega e amiga, por se disponibilizar em ajudar, a ensinar e também por ser um exemplo mais próximo a seguir. À Inês por ter sido a minha “redatora” e, embora não goste, agradeço pela grande amizade, pelos conselhos e por me ter dado motivação.

Agradeço também às minhas amigas que me acompanharam de mais perto nesta última aventura: “Bubas”, Diana, “Catjó”, “Kizomba”, Susana, “Mecê”, Joana Sousa e Cláudia da Silva, pelos ensinamentos que me transmitiram, força, entajuda e por todo o carinho.

À Tunassa, às minhas Veteranas, às minhas Caloiras (que isto vos sirva como fita de finalista) e Nabiças que partilharam, marcaram o meu percurso e por me proporcionarem um grande espírito académico, de camaradagem e boa amizade.

A toda a comunidade do ISA, professores e todos os colegas que me acompanharam desde a Licenciatura até ao final deste percurso, que me proporcionaram um ambiente saudável para aprender, crescer e me formar.

Agradeço aos meus amigos dos trampolins: Diogo, Filipa, Mariana, Margarida, Joana, Sara, João, Bruno e Sardinha que me introduziram a esta temática da cerveja numa outra vertente, com bom convívio e amizade.

Por último quero agradecer à minha família, pai, mãe, Teresa e o “mano” Biggy, pelo apoio incondicional e por me recarregarem com boas energias sempre que regresso a Leiria.

Resumo

O glúten é uma fração proteica presente em diversos cereais (trigo, centeio, cevada, aveia e cereais derivados), responsável por provocar alergias ou intolerâncias. Sendo a cerveja uma bebida elaborada por cereais, é uma bebida com glúten, impossibilitando o seu consumo por indivíduos com estas patologias. Conseqüentemente, o desenvolvimento de cervejas com menor teor de glúten, e que simultaneamente mantenham as características sensoriais típicas desta bebida, constitui um desafio à Indústria Alimentar.

O principal objetivo deste trabalho foi desenvolver uma cerveja sensorialmente apelativa de estilo *Weissbier*, com menor teor de glúten por co-fermentação com bactérias ácido lácticas (BAL). Assim, foi produzido um mosto típico de uma cerveja *Weissbier*, com elevado teor de glúten, realizando-se duas fermentações utilizando *Lb. brevis* e *Lb. plantarum* e uma estirpe comercial de *S.cerevisiae* (*Blanche*) (fermentação sequencial e fermentação simultânea), comparando os resultados com uma fermentação padrão apenas com *S.cerevisiae*.

Durante os ensaios fermentativos acompanhou-se a evolução microbiológica (contagem de células viáveis e cultiváveis) e físico-química (°Brix, pH, açúcares e ácidos orgânicos por HPLC). As cervejas obtidas foram analisadas relativamente ao teor de glúten (método ELISA) e amido (método da alfa-amilase), e ao grau de aceitação através de uma análise sensorial.

As fermentações realizadas foram bem-sucedidas não se verificando um impacto considerável das BAL nos parâmetros físico-químicos da cerveja, sobretudo no ensaio em simultâneo, atingindo-se níveis de etanol (2,8-4,5 % (v/v)) e açúcares residuais (6,4-7,85 g/L) similares ao ensaio de controlo. Por sua vez, a fermentação com BAL levou à redução do teor de glúten, sendo esta redução mais significativa na Fermentação Sequencial (de 113,1 ppm para 83,4 ppm), podendo ser considerada uma cerveja com “teor muito baixo de glúten”. No entanto, dado que esta bebida ainda contém glúten, não será destinada a doentes celíacos, mas sim a indivíduos com interesse em produtos com menor teor de glúten.

Palavras-chave: glúten, cerveja, Bactérias ácido lácticas, co-fermentação, *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

Gluten is a protein fraction present in several cereals (wheat, rye, barley, oats and derived cereals), responsible for causing allergies or intolerances. Since beer is a drink made with malted cereals, it has gluten, and cannot be consumed by people with these pathologies. Consequently, the development of beers with lower gluten content, while simultaneously maintaining the typical sensory characteristics of this drink, constitutes a challenge for the Food Industry.

The main objective of this work was to develop a sensory appealing Weissbier style beer, with lower gluten content by co-fermentation with lactic acid bacteria (LAB). A typical Weissbier beer wort was produced, with a high gluten content, by performing two fermentations using *Lb. brevis* and *Lb. plantarum* and a commercial strain of *S. cerevisiae* (*Blanche*) (sequential fermentation and simultaneous fermentation). Results were compared with a standard fermentation with *S. cerevisiae*.

During the fermentation trials, the microbiological (count of viable and cultivable cells) and physicochemical (°brix, pH, sugars and organic acids by HPLC) characteristics evolution was monitored. The beers obtained were analysed for gluten (ELISA assays) and starch (alpha-amylase method) content, and the degree of acceptance was evaluated through a sensory analysis.

The fermentations carried out were successful and there was no considerable observable impact of the LAB on the physical-chemical parameters of the final product, especially in the simultaneous fermentations, reaching ethanol levels (2.8-4.5% (v/v)) and residual sugars (6.4-7.85 g/ L) similar to the control test. Fermentation with LAB led to a reduction in the gluten content, which was significantly reduced in Sequential Fermentation (from a wort with 113.1 ppm to 83.4 ppm), which may bear the term “very low gluten”. However, as produced drinks still contain gluten, they are not adequate for celiac patients, but are great for individuals with an interest in products with lower gluten content.

Keywords: gluten, *Weissbier*, lactic acid bacteria, co-fermentation, *Saccharomyces cerevisiae*

Índice

Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de tabelas.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de abreviaturas.....	xi
1. Introdução.....	1
1.1. Enquadramento do trabalho.....	1
1.2. Objetivos.....	1
2. Revisão Bibliográfica.....	2
2.1. Glúten.....	2
2.1.1. O grão de cevada e de trigo.....	3
2.1.2. Doença celíaca.....	5
2.1.2.1. Limites toleráveis para a ingestão de glúten por celíacos.....	6
2.1.3. Métodos de deteção do glúten.....	7
2.2. Cerveja.....	9
2.2.1. Enquadramento histórico e cultural da cerveja.....	9
2.2.2. Matérias primas.....	10
2.2.2.1. Água.....	10
2.2.2.2. Cevada maltada.....	11
2.2.2.3. Lúpulo.....	11
2.2.2.4. Levedura.....	12
2.2.3. Processo de fabrico da cerveja.....	13
2.2.3.1. Maltagem.....	13
2.2.3.1.1. Molha.....	14
2.2.3.1.2. Germinação.....	14
2.2.3.1.3. Secagem.....	15
2.2.3.1.4. Desradiculação.....	16
2.2.3.1.5. Armazenamento.....	16
2.2.3.1.6. Torra.....	16
2.2.3.2. Brassagem.....	16

2.2.3.2.1.	Moenda	17
2.2.3.2.2.	Empastagem	17
2.2.3.2.3.	Filtração do mosto (<i>sparging</i>).....	18
2.2.3.2.4.	Ebulição do mosto	19
2.2.3.2.5.	Arrefecimento e Clarificação (<i>whirlpool</i>).....	19
2.2.3.3.	Fermentação	19
2.2.3.4.	Maturação	21
2.2.3.5.	Filtração.....	21
2.2.3.6.	Enchimento	22
2.3.	Microbiota da cerveja	22
2.3.1.	Leveduras	22
2.3.1.1.	Estirpes cervejeiras.....	22
2.3.1.2.	Papel das leveduras no perfil da cerveja	23
2.3.2.	Bactérias ácido lácticas	24
2.3.2.1.	Estirpes de bactérias lácticas.....	24
2.3.2.2.	Papel das bactérias lácticas no perfil da cerveja	25
2.4.	Diferentes estilos de cerveja.....	26
2.5.	Mercado de cervejas sem glúten em Portugal.....	27
2.6.	Processo de redução do glúten na cerveja	28
3.	Materiais e métodos.....	32
3.1.	Estirpes e matérias primas utilizadas.....	32
3.1.1.	Estirpes de leveduras e bactérias	32
3.1.2.	Malte	32
3.1.3.	Lúpulo	32
3.2.	Ensaio fermentativo	33
3.2.1.	Preparação do mosto	34
3.2.2.	Processo fermentativo do mosto.....	34
3.2.3.	Engarrafamento e maturação.....	35
3.3.	Análise microbiológica.....	35
3.3.1.	Determinação do número de células viáveis e células totais	35
3.3.2.	Determinação do número de células viáveis cultiváveis	36

3.4. Análises dos parâmetros físico químicos	36
3.4.1. Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix)	36
3.4.2. Determinação do pH	36
3.4.3. Determinação dos açúcares, etanol, glicerol e ácidos orgânicos	36
3.4.4. Determinação do amido	37
3.4.5. Determinação do teor de glúten.....	38
3.5. Análise sensorial	39
3.6. Análise estatística	40
4. Resultados e Discussão	41
4.1. Seleção do estilo de cerveja utilizado	41
4.2. Caracterização e seleção das estirpes e das condições de fermentação	41
4.3. Evolução dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos ao longo dos ensaios fermentativos 42	
4.3.1. Evolução da microbiota.....	42
4.3.2. Evolução dos parâmetro físico-químicos ao longo da fermentação.....	44
4.3.2.1. Evolução do pH e do consumo dos sólidos solúveis totais	44
4.3.2.2. Evolução do consumo de substratos e produção metabólitos ao longo da fermentação .	46
4.3.2.3. Análise do amido	48
4.3.2.4. Análise do teor de glúten	49
4.4. Avaliação dos parâmetros em análise na pós fermentação.....	50
4.5 Análise sensorial.....	51
5. Conclusões finais e perspectivas futuras	53
6. Bibliografia	I
7. Anexos.....	V
Anexo I: Curvas de calibração HPLC	V
Anexo II: Amido	VIII
Anexo III: Curva de Calibração da Gliadina para o método de quantificação do glúten	IX
Anexo IV: Prova de análise sensorial de cervejas	X

Lista de tabelas

Tabela 1: Estimativa da composição química do grão de cevada comparativamente à do trigo (Reinold, 1997).	4
Tabela 2: Principais enzimas que atuam no processo de empastagem. (Adaptado de: Eßlinger, 2009).	18
Tabela 3: Características das Estirpes <i>Saccharomyces</i> (Zainasheff & White, 2019).	23
Tabela 4: Estilos de cerveja (Adaptado de: Strong & England, 2015).	27
Tabela 5: Mercado português de cervejas sem glúten.	28
Tabela 6: Estirpes de leveduras e bactérias utilizadas nos ensaios fermentativos.	32
Tabela 7: Receita para a obtenção do mosto da cerveja do estilo Weissbier.	33
Tabela 8: Detalhes sobre os ensaios executados neste estudo.	33
Tabela 9: Composição físico-química do mosto Weissbier.	41
Tabela 10: Características dos três ensaios no final da fermentação.	50

Lista de figuras

Figura 1: Representação esquemática da estrutura do glúten (Adaptado de: Bathula, 2018).	2
Figura 2: Esquema representativo da secção transversal longitudinal do grão de cevada (Adaptado de: Johnson & Wallace, 2019).	3
Figura 3: Vilosidades intestinais de um indivíduo saudável (A) e de um doente celíaco (B) (Adaptado de: Schäer Gluten-Free, 2020).	5
Figura 4: Símbolo da Certificação da APC presente nas embalagens de produtos sem glúten produzidos em Portugal (Fonte: Associação Portuguesa de Celíacos, 2020).	7
Figura 5: Diagrama do processo produtivo de cerveja. Elaboração própria.	13
Figura 6: Diagrama do processo de maltagem. Elaboração própria.	14
Figura 7: Diagrama do Processo de Brassagem. Elaboração própria.	17
Figura 8: Adaptação de Chris White (1998) da Roda dos sabores da cerveja. (Fonte: Jecas Brewery, 2014).	24
Figura 9: Fontes de degradação enzimática de glúten (Adaptado: Scherf et al., 2018).	30
Figura 10: Esquema da diluição das amostras iniciais para usar na determinação do amido.	37
Figura 11: Esquema representativo da microplaca com as soluções-padrão em duplicado (por ordem crescente de concentração na primeira e segunda coluna) e as amostras em estudo em duplicado com a adição de cromogéneo (A). As mesmas soluções com posterior adição de solução-tampão de paragem (B).	39
Figura 12: Evolução da viabilidade da estirpe <i>S. cerevisiae</i> Blanche (comercial). (A) Evolução das células viáveis cultiváveis ao longo da fermentação dos três cenários existentes. (B) Variação da viabilidade relativa dos diferentes ensaios fermentação dos três cenários existentes.	43
Figura 13: Evolução das células viáveis cultiváveis das bactérias ácido lácticas (<i>L. brevis</i> e <i>L. plantarum</i>).	44
Figura 14: Evolução pH (à esquerda) e do grau Brix (à direita) nos três ensaios executados durante a etapa de fermentação.	45
Figura 15: Evolução do consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol no ensaio Controlo (A), Fermentação Sequencial (B) e do Consórcio (C).	46
Figura 16: Quantificação do teor de amido (A) e dos açúcares redutores (B) no início e final da fermentação.	48
Figura 17: Teor em glúten nas cervejas produzidas pelo método padrão e por co-fermentação com BAL (adição sequencial e consórcio).	49
Figura 18: Resultados da análise sensorial dos produtos finais relativos aos três ensaios efetuados.	51
Figura 19: Retas de calibração do ácido acético (A) e ácido láctico (B) determinados por HPLC.	VI
Figura 20: Retas de calibração da glucose (A), maltose (B), maltotriose (C) e frutose (D) determinadas por HPLC.	VI
Figura 21: Retas de calibração do etanol (A) e glicerol (B) determinadas por HPLC.	VII
Figura 22: Retas de calibração de glucose efetuada para a determinação do teor de amido nas amostras antes e após fermentação.	VIII

Figura 23: Curva de calibração de gliadina para a quantificação do teor de glúten das amostras em estudo..... IX

Lista de abreviaturas

(m/V): massa por volume

(v/v): volume por volume

°Brix: grau Brix

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ANOVA: Análise de Variância

AOECS: *Association Of European Coeliac Societies*

APC: Associação Portuguesa de Celíacos

ATP: adenosina tri-fosfato

BAL: Bactérias Ácido Lácticas

CGT: *Crossed Grain Trademark*

DC: Doença Celíaca

DNS: ácido 3,5-dinitrosalicílico

DO_{640nm}: densidade óptica a 640nm

EBC: *European Brewery Convention*

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

FAO: Food Agriculture Organization

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

ISA: Instituto Superior de Agronomia

LAB: Lactic Acid Bacteria

MALDI-TOF MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation *Time-Of-Flight* Mass Spectrometry

MRS: *De Man, Rugosa and Sharpe*

NAD: Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado

NADH: Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

OMS: Organização Mundial de Saúde

PBS: *Phosphate buffer saline*

PCR: Polymerase Chain Reaction

PVPP: polivinilpolipirrolidona

rpm: rotações por minuto

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com sulfato dodecílico de sódio

TG: transglutaminase microbiana

tTG2: transglutaminase tecidual 2

UFC: Unidade Formadora de Colónia

YPD: *Yeast extract Peptone Dextrose*

1. Introdução

1.1. Enquadramento do trabalho

O interesse dos consumidores por alimentos que possam contribuir para a manutenção da saúde, ou até mesmo, para a sua melhoria é cada vez maior. Os alimentos funcionais têm ganho notoriedade, uma vez que podem diminuir o risco de doenças, proporcionando benefícios nutricionais, metabólicos específicos e dietéticos (Priest & Stewart, 2006). A facilidade de acesso à informação, a exigência relativamente às matérias primas, aos processos produtivos e às propriedades funcionais do produto final têm desafiado o setor alimentar em termos de inovação e desenvolvimento de produtos.

O glúten é composto por uma mistura complexa de proteínas, presente em cereais como o trigo, centeio, cevada e aveia, e em cereais obtidos por cruzamento dos referidos anteriormente. Essas proteínas fazem parte da fração insolúvel, não sendo por isso digeridas no trato gastrointestinal e provocando em determinados indivíduos alergias ou intolerância (Biesiekiersk, 2017; Codex Alimentarius Commission, 2015).

O processo produtivo da cerveja é o resultado de uma série complexa de reações químicas, iniciando-se pela maltagem e moenda, seguidas da brassagem, fermentação e terminando na maturação, etapa que permite a estabilização das suas características sensoriais. Sendo a cerveja uma bebida fermentada elaborada a partir de cereais maltados, isto é, uma bebida com glúten, esta terá de ser excluída da dieta alimentar dos indivíduos que apresentem esta incompatibilidade.

Observando o mercado atual de cervejas sem glúten, este é representado por produtos que não são sensorialmente apelativos, dado que para a sua redução ou eliminação, o malte de cevada é substituído por cereais ou pseudocereais isentos de glúten. Isto resulta em produtos que comprometem a identidade de uma bebida milenar com grande impacto cultural, a cerveja.

1.2. Objetivos

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento de uma cerveja sensorialmente apelativa do estilo *Weissbier* com menor teor de glúten, utilizando processos de co-fermentação entre leveduras e bactérias lácticas. Este é um tipo de cerveja à base de trigo, um cereal com uma fração proteica elevada. Será por isso interessante estudar a possibilidade de redução do glúten com recurso as estirpes de bactérias lácticas pré-selecionadas. Sendo esta uma bebida que ainda terá algum glúten na sua composição, não será indicada para doentes celíacos, mas sim para indivíduos com interesse em produtos de menor teor em glúten.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Glúten

Segundo o *Codex Alimentarius*, o glúten é a fração proteica do cereal, nomeadamente, do trigo, centeio, cevada, aveia ou até mesmo das variedades cruzadas e derivados dos mesmos (Codex Alimentarius Commission, 2015). As proteínas constituintes do glúten representam cerca de 70 a 80% do teor total de proteínas do grão (Watson et al., 2019).

O glúten é originado pela combinação de dois tipos de proteínas presentes no endosperma dos cereais: as monoméricas prolaminas (cuja denominação varia consoante o tipo de cereal) e as poliméricas gluteninas (Watson et al., 2019). Estas duas frações de proteínas, quando juntas, após hidratação e moenda dos cereais, formam uma matriz tridimensional insolúvel em água. A matriz possui ainda propriedades viscoelásticas e capacidade de reter gases (Codex Alimentarius Commission, 2015). Na Figura 1 estão esquematicamente representadas as proteínas constituintes do glúten e a formação da mesma.

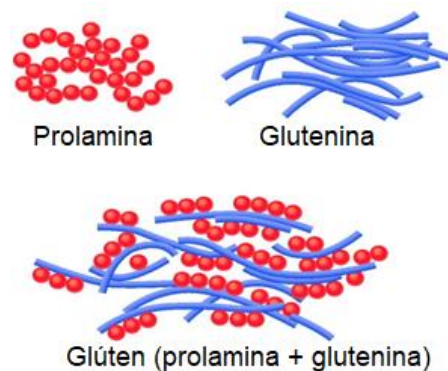


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do glúten (Adaptado de: Bathula, 2018).

Devido ao interessante comportamento viscoelástico, o glúten confere diversas propriedades desejadas na indústria alimentar, tais como: aumento de volume, mastigabilidade e textura nos alimentos. Além de ser usado em fontes alimentares como o pão, massas alimentícias e cerveja, o glúten também é aproveitado de forma modificada como intensificador de sabor, espessante, emulsionante, para enchimento e como ingrediente de fortificação, não só em produtos alimentares, mas também em cosméticos, medicamentos e suplementos nutricionais (Scherf & Poms, 2016).

Já na produção de cerveja, as proteínas presentes na cevada e também na levedura contribuem para a qualidade do produto final, nomeadamente a produção e estabilização da espuma e sabor (Colgrave et al., 2017a). Durante a produção de cerveja a partir de grãos que contêm glúten, a proporção da fração proteica depende fortemente das diversas fases do processo, tais como: maltagem dos cereais, moenda, brassagem, ebulição do mosto, arrefecimento e clarificação, fermentação e filtração, sendo possível reduzir o teor de glúten entre 46 a 79% (Colgrave et al., 2017a; Fiedler et al., 2019).

2.1.1. O grão de cevada e de trigo

De um modo geral os grãos de cereais apresentam uma forma elíptica e alongada, com comprimento entre 5 e 9 mm e com um peso médio compreendido entre 35 e 50 mg. Os cereais são constituídos por casca, pericarpo, testa, camada de aleurona, endosperma e embrião. Em termos de matéria seca total, consoante o tipo de cereal, esta é representada por cerca de 9 a 13% de casca, pericarpo e testa, 2% a 5% de camada de aleurona, 2 a 3% para o embrião, sendo a maior estrutura o endosperma com 76 a 82% (Johnson & Wallace, 2019). A Figura 2 ilustra a disposição destas estruturas no grão de cevada.

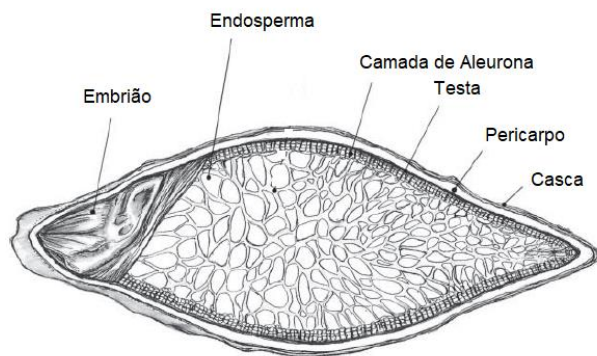


Figura 2: Esquema representativo da secção transversal longitudinal do grão de cevada (Adaptado de: Johnson & Wallace, 2019).

A casca, sendo a camada mais externa do grão, é insolúvel e rígida, desempenhando o papel de agente protetor. A existência de danos mecânicos nesta estrutura, essencialmente constituída por celulose, polifenóis e β -glucanos, leva a crer que também possam existir danos no embrião, provocando o crescimento incontrollável e a redução do potencial de filtração. Além disso, durante a produção de cerveja, este também funciona como agente filtrante quando ocorre a separação entre o mosto e os grãos utilizados (dreche) (Mallet, 2014).

O pericarpo também é constituído por celulose e a testa por açúcares, aminoácidos e lípidos. Estas duas estruturas constituem uma camada semipermeável, evitando que entre água para o interior do grão, inibindo a difusão dos nutrientes para o exterior e ainda protegendo o interior do grão de possíveis microrganismos contaminantes (Mallet, 2014).

A camada de aleurona reveste o endosperma, sendo composta por proteínas, enzimas, lípidos, β -glucanas, vitaminas, açúcares e minerais. É nesta camada que estão armazenadas as enzimas hidrolíticas responsáveis por degradar o amido em açúcares que vão permitir o desenvolvimento do embrião (Wrigley & Batey, 2010).

O endosperma, a estrutura com maior representação, é estimado que tenha cerca de 80000-90000 células no grão de cevada e 60000 células no grão de trigo. É onde se encontra o amido, reserva energética para que o grão se desenvolva e dê origem à futura planta (Eßlinger, 2009). Já o embrião é a estrutura responsável pelo desenvolvimento do grão, sendo fundamental para a germinação (Eßlinger, 2009).

Relativamente aos compostos químicos presentes nos cereais, apenas serão evidenciados os compostos presentes no grão de trigo e de cevada com maior influência na produção de malte e, posteriormente, de cerveja, tais como: o amido, proteínas, água e gordura (Reinold, 1997). Na Tabela 1 são apresentadas as composições dos mesmos em ambos os cereais referidos.

Tabela 1: Estimativa da composição química do grão de cevada comparativamente à do trigo (Reinold, 1997).

	Cevada	Trigo
Amido (%)	60-65	57
Proteína (%)	9-11,5	12,5
Água (%)	4-6	13,5
Gordura (%)	1,65	1,9

A cevada é o cereal mais utilizado na indústria cervejeira. Além de possuir características que favorecem o processo de produção a nível tecnológico, explicadas em maior detalhe na seção 2.2.2.2, também apresentam vantagens a nível sensorial. Como é visível na Tabela 1, a cevada contém maiores quantidades de amido relativamente ao trigo. Este composto representa a reserva energética, que durante a brassagem será decomposta em açúcares fermentescíveis, por ação das enzimas ativadas no processo de maltagem, para posterior utilização durante a fermentação (Pinto, 2013).

Relativamente às proteínas, a ação de proteases quebra as ligações pépticas entre as longas cadeias de aminoácidos, disponibilizando péptidos e aminoácidos livres que também serão utilizados como substrato pela levedura durante a fermentação do mosto (Briggs et al., 2014). As proteínas presentes nos cereais classificam-se em solúveis (globulinas e albuminas) ou formadoras de glúten (prolaminas e gluteninas). No caso do trigo, as últimas constituem cerca de 85% do total de proteínas, estando localizadas principalmente no endosperma, já para a cevada estas duas estão representadas em cerca de 30 a 40% do total de proteínas (Eßlinger, 2009; Priest & Stewart, 2006). Esta fração proteica difere entre o grão de cevada e o de trigo, apresentando um papel relevante na qualidade do produto final, pois é responsável por diversas características: valor nutricional; cor e sabor da cerveja; desenvolvimento da espuma; e estabilidade coloidal da cerveja. Desta forma, resultando em cervejas à base de trigo (que contém pelo menos cerca de 50% de malte de trigo) com teor de glúten relativamente superior ao de cervejas produzidas apenas com malte de cevada (Wrigley & Batey, 2010).

Como observado na Tabela 1, o trigo contém maior teor proteico que a cevada, possivelmente resultando em maior formação de espuma, podendo haver pouca estabilidade coloidal da cerveja sendo que maiores teores de proteína resultam em menor extrato fermentável por grão (Mallet, 2014).

Relativamente ao teor de humidade no grão, este constitui um fator relevante na prevenção da deterioração. Assim, o armazenamento seguro dos cereais deve ser feito a humidade inferior à que estes possuem, de modo a impedir que ocorram transformações químicas indesejáveis (respiração e transpiração), atividade enzimática e/ou crescimento microbiano (Priest & Stewart, 2006).

Existem ainda outros compostos presentes nestes cereais que são importantes na produção de cerveja como os β -glucanos e as enzimas.

Os β -glucanos são polissacáridos não amiláceos de elevado peso molecular. No fabrico de cerveja estes compostos são indesejáveis, uma vez que aumentam a viscosidade do mosto, prejudicando o processo de filtração (Lewis & Young, 2002).

As enzimas, sendo agentes biocatalizadores, são responsáveis por potenciar a taxa das reações químicas que ocorrem durante a produção de cerveja, nomeadamente a germinação do grão. Porém, a sua ação depende de determinadas variáveis como o pH e a temperatura do meio. As enzimas como a α -amilase e a β -amilase degradam o amido convertendo-o em açúcares fermentescíveis que podem ser usados como substrato pela levedura para iniciar o processo de fermentação. Já as β -glucanases atuam nos β -glucanos, desconstruindo-os em unidades de D-glucose, de menor peso molecular, que podem também ser consumidas pela levedura durante o processo fermentativo (Lewis & Young, 2002).

2.1.2. Doença celíaca

A doença celíaca (DC) é uma doença crónica autoimune, que ocorre em indivíduos geneticamente predispostos aquando da ingestão de alimentos que contêm glúten.

A ingestão destes alimentos por parte dos doentes celíacos desencadeia uma resposta inflamatória, onde as prolinas e gluteninas que constituem o glúten atravessam o lúmen intestinal, provocando inflamação e danos nas vilosidades intestinais (Figura 3) e impedindo a absorção de nutrientes (Osorio et al., 2019).

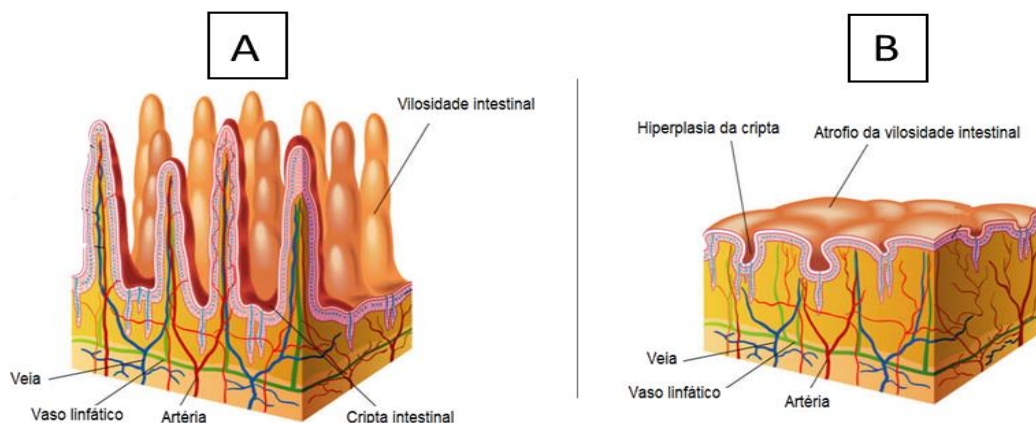


Figura 3: Vilosidades intestinais de um indivíduo saudável (A) e de um doente celíaco (B) (Adaptado de: Schäer Gluten-Free, 2020).

Na doença celíaca, a resposta ao glúten por parte do organismo é mediada pelo sistema imunitário através da produção de anticorpos que vão atuar contra a fração proteica que constitui o glúten e a enzima transglutaminase tecidual 2 (tTG2). Esta enzima tem a capacidade de modificar quimicamente a fração proteica do glúten, aumentando o seu reconhecimento pelo sistema imunitário. Porém, em indivíduos celíacos, o sistema imunitário identifica a tTG2 como um inimigo, desencadeando uma resposta imunitária. Após a modificação dos péptidos por esta enzima, estes invadem o epitélio

intestinal provocando uma série de reações, essencialmente sintomas intestinais. Paralelamente à doença celíaca existe ainda a alergia e a sensibilidade ao trigo. A alergia envolve o sistema imunitário inato e adaptativo e é uma reação rápida, podendo ocorrer minutos ou horas após a ingestão do alergénio, com sintomas como anafilaxia e/ou dermatite. Já a sensibilidade ao trigo, está associada ao sistema imunitário inato e os sintomas podem ser fadiga, depressão, angústia, enxaquecas e perturbações gastrointestinais. Estas três reações despoletadas pela ingestão de alimentos com glúten afetam cerca de 7% da população mundial. Contudo, crê-se que estas doenças são subdiagnosticadas e deveriam ser rastreadas em sujeitos que apresentem alguns sintomas (Osorio et al., 2019).

Relativamente aos doentes celíacos, estes mostram diferentes graus de sensibilidade às proteínas do glúten, sendo que em geral conseguem tolerar até 20 miligramas de glúten por quilograma de produto alimentar consumido em um dia (Osorio et al., 2019).

Atualmente, o único modo de evitar estas reações é adotar permanentemente uma dieta isenta de glúten. Dieta essa que por vezes se torna difícil, uma vez que ocorrem contaminações acidentais devido à ubiquidade dos grãos. Mesmo em produtos alimentares alegadamente “sem glúten” poderão ocorrer este tipo de contaminações.

Confrontando esta problemática, a indústria alimentar tem abraçado o desafio de criar produtos isentos de glúten como massas alimentícias, produtos de panificação ou cervejas. Todavia, estudos indicam insatisfação por parte dos consumidores relativamente à qualidade dos produtos, desde a aparência, textura e sabor aos valores nutricionais, uma vez que estes são nutricionalmente desequilibrados, isto é, ricos em açúcares e lípidos, mas com carência de vitaminas, fibras e minerais. Por todas as razões mencionadas anteriormente surge a importância de encontrar métodos que detetem, quantifiquem e reduzam o teor de glúten de forma a garantir segurança dos alimentos para doentes celíacos (Fiedler et al., 2019).

2.1.2.1. Limites toleráveis para a ingestão de glúten por celíacos

O *Codex Alimentarius*, desenvolvido pela Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (*Food Agriculture Organization*, FAO) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), é um conjunto de normas alimentares que desenvolve definições e exigências para os alimentos, assegurando a qualidade e segurança dos produtos bem como a saúde dos consumidores. Estas regras acabam por auxiliar o comércio internacional de alimentos nos países membros desta comissão.

Segundo o *Codex Alimentarius*, os alimentos isentos de glúten definem-se por géneros alimentícios que não contêm trigo, centeio e cevada, aveia ou as variedades das mesmas, bem como produtos cujas matérias primas mencionadas anteriormente sejam submetidas a tratamentos que reduzam o teor de glúten para valores finais inferiores a 20 mg/kg (*Standard For Foods For Special Dietary Use For Persons Intolerant To Gluten CXS 118-1979, 2015*).

Relativamente à rotulagem dos géneros alimentícios, o regulamento (EU) n.º 1169/2011 define que os produtos que apresentem na sua constituição substâncias que providenciem qualquer tipo de intolerância ou alergia devem estar destacadas nos rótulos. Mais especificamente, no regulamento (CE)

n.º 41/2009 relativo a produtos adequados para pessoas com predisposição a intolerância permanente ao glúten, estes produtos devem estar devidamente rotulados contendo a menção “teor muito baixo de glúten” se o produto final não abranger um nível final de glúten superior a 100 mg/kg e a expressão “isento de glúten” ou semelhante, caso o produto final não contiver um teor de glúten superior a 20 mg/kg (Vassiliou, 2009).

O CGT (*Crossed Grain Trademark*) é o símbolo internacional “sem glúten” que é regulado pela AOECS (*Association Of European Coeliac Societies*). Esta entidade permite às associações membro, como a Associação Portuguesa de Celíacos (APC), a emissão de uma licença de utilização deste símbolo (Figura 4) nos produtos de empresas com sede em Portugal. Além de garantir vantagem comercial para as empresas de produtos sem glúten (teor de glúten com teor máximo de 20 mg/kg), também transmite credibilidade nos produtos face à população portuguesa com restrição alimentar ao glúten.



Figura 4: Símbolo da Certificação da APC presente nas embalagens de produtos sem glúten produzidos em Portugal (Fonte: Associação Portuguesa de Celíacos, 2020).

2.1.3. Métodos de deteção do glúten

A deteção de glúten tem demonstrado ser um desafio dada a natureza heterogénica dos produtos alimentares e dos cereais que os compõem. Também se depara com a complexidade das matrizes alimentares, desde os produtos submetidos a um processo térmico e extrusão (como produtos de panificação e massas alimentícias), aos produtos onde o glúten é parcialmente hidrolisado, como é o caso das cervejas, xaropes e extratos de malte (Scherf & Poms, 2016).

No decorrer dos anos foram desenvolvidos diversos métodos analíticos favorecendo a deteção e quantificação desta fração proteica, tais como: PCR (reação em cadeia da polimerase), espectrometria de massa “matrix-assisted laser desorption/ionisation *time-of-flight*” (MALDI-TOF MS), eletroforese de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) (Osorio et al., 2019). De um modo sucinto, estes métodos podem ser classificados em métodos genómicos, proteómicos e imunológicos (Osorio et al., 2019).

Nos métodos genómicos recorre-se à técnica PCR, que se baseia na determinação de sequências específicas de ADN. Estes métodos revelam teoricamente uma elevada sensibilidade e especificidade de resultados, contudo são impróprios para amostras processadas e hidrolisadas, uma vez que nestes processos ocorre uma degradação do ADN (Scherf & Poms, 2016).

Já nas técnicas proteômicas, a espectrometria de massa MALDI-TOF MS baseia-se na digestão de proteínas isoladas com recurso a uma enzima conhecida, como a pepsina, tripsina ou quimotripsina. A sua utilização como método quantitativo é por si só considerada insuficiente devido à sua baixa sensibilidade. As limitações deste método podem ser superadas com recurso a HPLC (Scherf & Poms, 2016).

A eletroforese permite separar as proteínas ao longo de um substrato em gel consoante a massa molecular, com recurso a um campo elétrico. Este método apesar de ser simples e permitir a análise discriminada tanto no tamanho como no tipo de proteína, é um processo demorado e com diversas etapas.

Todos os métodos analíticos mencionados oferecem alta precisão de resultados. Contudo, são dispendiosos e pouco práticos pois requerem equipamentos e necessitam de manutenção por técnicos com competências especializadas (Osorio et al., 2019).

Atualmente, o Comité de Método de Análise e Amostragem do *Codex* reconhece o método ELISA como o padrão na deteção e quantificação do teor de glúten. Este método imunológico é o mais utilizado, uma vez que é uma técnica com grande fiabilidade, de rápido diagnóstico e eficiente, necessitando de pouca amostra. A concentração mínima de glúten aceitável para análise é de 3 ppm em termos do nível de deteção e na ordem dos 5 ppm para a quantificação, valores bem abaixo do limite estabelecido pelo *Codex Alimentarius* (20 mg de glúten por quilograma de produto). O ensaio baseia-se na deteção das ω -gliadinas (fração termoestável das gliadinas), permitindo a sua deteção aquando do processamento do produto alimentar (Osorio et al., 2019).

Os sistemas ELISA frequentemente utilizados podem ser: ELISA sanduíche ou ELISA competitivo. Estes apresentam diferentes resultados quantitativos para uma mesma amostra em estudo, uma vez que os anticorpos utilizados, procedimentos de extração e formato dos kits diferem entre eles (Fiedler et al., 2019). Enquanto o sistema sanduíche exige, no mínimo, a presença de dois epítomos de ligação e é direcionado para alimentos naturais e produtos alimentares processados por calor; o ELISA competitivo não requer múltiplos epítomos e é adequado para produtos alimentares e bebidas fermentadas e hidrolisadas, como a cerveja (Watson et al., 2018).

De uma forma muito sucinta, o método baseia-se na reação antigénio-anticorpo. Os poços presentes na microplaca estão revestidos com gliadina, onde as amostras em estudo são preparadas juntamente com anticorpos R5 que reconhecem sequências potencialmente tóxicas, tal como a QQFPF, que estão repetidamente presentes nas moléculas de prolaminas. As gliadinas existentes (livres e imobilizadas) competem pela ligação aos anticorpos, sendo estas medidas por absorvância e as suas concentrações calculadas, o que permite determinar as concentrações de glúten nas amostras.

Todavia, este método também apresenta algumas desvantagens, como o aparecimento de falsos positivos, devido à exigência da reação enzimática que ocorre na deteção/quantificação. Outra desvantagem é a possibilidade de ocorrência de subestimação dos resultados, pois, como foi referido, apenas uma fração (as ω -gliadinas) é detetável, representando apenas entre 6 a 20% das prolaminas totais, consoante o tipo de cereal testado (Osorio et al., 2019).

2.2. Cerveja

De acordo com o descrito na Portaria n.º 1/96, de 3 de janeiro de 1996, a cerveja define-se como “uma bebida obtida por fermentação alcoólica, mediante leveduras selecionadas do género *Saccharomyces*, de um mosto preparado a partir de malte de cereais, e outras matérias primas amiláceas ou açucaradas, ao qual foram adicionadas flores de lúpulo ou seus derivados e água potável”.

O termo básico de cerveja está associado a uma panóplia de estilos de cerveja que diferem entre si, desde as características físicas até ao perfil sensorial. De um modo geral, pode ser considerada uma bebida cuja preparação é feita com base em malte de cereais, principalmente cevada, com adição de lúpulo, em meio aquoso, onde leveduras do género *Saccharomyces* (de alta ou baixa fermentação) utilizam os açúcares fermentescíveis do mosto, resultando assim numa bebida carbonatada de baixo teor alcoólico. Em termos nutricionais, o produto final é essencialmente constituído por hidratos de carbono, proteínas, vestígios de lípidos e sais minerais.

2.2.1. Enquadramento histórico e cultural da cerveja

A descoberta e a produção de cerveja acompanham a história da Humanidade desde os primórdios da civilização.

Acredita-se que a origem da cerveja remonta à revolução Neolítica (9000 anos antes de Cristo (a.C.)), onde os povos nómadas transitaram do período de caça para desenvolver a capacidade de domesticação de animais e culturas agrícolas, de modo a obter alimento, tornando-se assim sedentários. Possivelmente, a fermentação acidental dos cereais foi despoletada devido à necessidade de racionamento das culturas, do seu armazenamento e conservação pós-colheita (Cabras & Higgins, 2016).

Existem muitas evidências de produção de bebidas fermentadas a partir de cereais em diferentes regiões do globo, como na China, Norte de África e Europa (Cabras & Higgins, 2016).

A prova mais antiga de bebidas fermentadas, com uma datação de cerca de 7000 a 9000 anos, foi encontrada na China. Foram analisados fragmentos de cerâmica, por diversos métodos, tais como espectrometria de massa, análise de isótopos e cromatografia, que revelaram vestígios de uma bebida fermentada à base de uvas silvestres, mel e arroz (Cabras & Higgins, 2016).

Já na Antiga Mesopotâmia, também se descobriram fragmentos arqueológicos de olaria com datação de cerca de 6000 a.C., com vestígios de cerveja. Outra prova química foi encontrada nas montanhas de Zagros (atual Irão Ocidental): um recipiente de cerâmica, com cerca de 5500 anos, que continha oxalato de cálcio, sendo este composto considerado uma assinatura da produção de cerveja (Barth, 2013).

No antigo Egito, o pão e a cerveja ditavam a dieta egípcia: desde os Faraós, que seriam enterrados com várias oferendas como cerveja, até aos escravos, cujos salários eram pagos em cereais. A cerveja era produzida à base de diversos cereais, sendo a cevada o principal, devido às condições climáticas que proporcionavam a vasta produção desta cultura (Barth, 2013).

Relativamente à cultura e tecnologia de fabrico desta bebida milenar no continente Europeu, os primeiros indicadores de produção de cerveja são de 3600 a.C., porém apenas existem evidências de 3000 a.C., na Grécia antiga.

Tanto na Grécia como em Roma, esta bebida teria uma formulação idêntica à produzida no Egípto, devido à influência desta civilização. Contudo, o vinho continuava a ser a bebida mais consumida, devido às condições climáticas que beneficiavam as culturas vinícolas. Em ambos os países, o consumo de vinho era direcionado para as classes mais altas, enquanto que a cerveja se destinava a classes mais pobres, que eram consideradas pouco civilizadas e “bárbaras”, expressão esta utilizada para referenciar os povos do Norte e Este da Europa, onde a cerveja seria a bebida mais popular.

Após a queda do império Romano por parte dos povos germânicos e até meados do século XII, a cerveja tornou-se a bebida de destaque e a prática de fabrico ficou ao encargo da Igreja Cristã, sendo realizada apenas em mosteiros, conventos e abadias, onde foram estudadas e desenvolvidas técnicas de produção.

Já no século XV, devido ao uso negligente de cereais na produção de cerveja, foi instaurada a Lei da Pureza (*Reinheitsgebot*), que ditava as matérias primas da cerveja: água, lúpulo e malte de cevada, sendo a levedura desconhecida nesta época. Qualquer outra matéria prima seria considerada ilegal, excetuando a produção da *weizen beer*, onde se utilizava malte de trigo (Barth, 2013).

Mais tarde, Luis Pasteur (século XIX) descobriu que as leveduras seriam as responsáveis pelo processo fermentativo alcoólico que ocorre durante a produção de cerveja. Após esta descoberta, de modo a impedir a evolução de possíveis fermentações indesejadas, criou o processo designado por pasteurização, permitindo assim eliminar microrganismos indesejáveis e tornar os produtos alimentares mais seguros (Barth, 2013).

Além destes métodos, outras inovações biotecnológicas possibilitaram o melhoramento do fabrico desta bebida, aumentando o seu tempo de prateleira, com conseqüente aumento da produção e consumo de cerveja pelo mundo, como é observado atualmente.

2.2.2. Matérias primas

Genericamente, a cerveja é produzida a partir de quatro ingredientes: água, cereais maltados, lúpulo e levedura.

A indústria cervejeira, que está em crescente desenvolvimento, de modo a expandir e melhorar a experiência sensorial e de consumo, parte para a definição de estilos de cerveja e exploração de combinações, com variações quantitativas e qualitativas das matérias primas essenciais, procurando a diferenciação e sucesso.

2.2.2.1. Água

A água é o constituinte principal da cerveja, correspondendo a cerca de 90% do produto final (Priest & Stewart, 2006).

A qualidade e a composição da água determinam o fabrico da cerveja, uma vez que esta influencia a maltagem, a brassagem, a qualidade do mosto e a diluição da cerveja. A água deverá ser potável, insípida, inodora, livre de microrganismos patogénicos e impurezas que prejudiquem ou diminuam a qualidade do produto final (Briggs et al., 2014).

Porém, a água não deve ser totalmente pura, uma vez que é necessário que haja a presença de iões metálicos de modo a auxiliar o processo de fabrico da cerveja. As diferentes composições da

água, isto é, águas com pH diferentes e com presença ou ausência de certos íons dão origem a diversos tipos de cerveja (Barth, 2013).

Os íons existentes na água são: cálcio, magnésio, sódio, potássio, sulfato, fosfato, cloreto, carbonato, nitritos e, com menor concentração, os íons de zinco, cobre e ferro (Briggs et al., 2014). Estes têm um papel preponderante na produção de cerveja, por exemplo, o íon cálcio é responsável pela estabilização enzimática, auxiliando no metabolismo e na floculação da levedura e coagulação de proteínas; o magnésio permite reduzir o pH do mosto e é considerado um micronutriente essencial para o desenvolvimento da levedura; já o sulfato potencia o sabor e aroma do lúpulo. Desta forma, o equilíbrio da composição da água melhora a eficiência da brassagem, garante uma boa fermentação e auxilia na clarificação da cerveja (J. Palmer & Kaminski, 2013).

2.2.2.2. Cevada maltada

Atualmente, para a produção de cerveja é permitido utilizar diversos tipos de cereais, sejam eles maltados ou não. A cevada (*Hordeum vulgare L.*) é necessária, pois possui diversas vantagens quer a nível sensorial como tecnológico, sendo utilizada desde a origem desta bebida milenar. Comparativamente a outros cereais, a cevada possui maior facilidade de controlo da germinação (etapa da maltagem), maior poder diastático, com um nível superior em termos sensoriais e a casca atua como agente natural filtrante do mosto (Eßlinger, 2009).

Entre outros parâmetros a serem controlados e que serão observados no processo de maltagem, o poder diastático é um parâmetro que quantifica as enzimas ativadas e produzidas durante a maltagem. A cevada, quando é direcionada para o processo de maltagem, é sujeita a alterações físicas e bioquímicas no grão, onde ocorre a síntese de enzimas proteolíticas e amilolíticas, como a α -amilase e β -amilase. Estas enzimas são responsáveis por degradar o amido durante a brassagem, transformando-o em açúcares fermentescíveis.

Assim, é importante que ocorra a modificação da estrutura do grão, de modo a que o cereal esteja em condições nos passos seguintes do processo e para que haja um melhor aproveitamento relativamente à disponibilidade do cereal na produção de cerveja (Pinto, 2013).

2.2.2.3. Lúpulo

O *Humulus lupulus L.* é uma espécie herbácea perene e dióica da família *Cannabaceae*, de origem europeia, cujas flores fêmeas contêm quantidades de resinas amargas e óleos essenciais, conferindo à cerveja um característico sabor amargo.

O lúpulo é o principal aditivo de paladar e aroma da cerveja, intervém ainda na estabilidade microbiológica e físico-química, bem como na esterilização do mosto, uma vez que possui propriedades antissépticas (De Keukeleire, 2000; Nance & Setzer, 2011). Esta matéria prima, é geralmente apresentada em *pellets* ou extrato de lúpulo.

O lúpulo, consoante a fração presente de resina e óleos essenciais, pode ser classificado em dois tipos: de aroma ou de amargor. Os lúpulos de aroma contêm uma maior fração de óleos essenciais. Estes compostos são voláteis, sendo libertados em grande parte durante a fervura, conferindo aroma à cerveja (Bamforth et al., 2006; G. H. Palmer, 2017). Já a fração resinosa é responsável pela característica amarga no produto final, devido à presença de ácidos alfa. Estes compostos são

insolúveis em água até serem submetidos a uma isomerização, que ocorre no processo de ebulição. Quanto mais prolongada for a fervura, maior a percentagem de isomerização e, portanto, mais amarga será a cerveja.

Existem cerca de 265 variedades de lúpulo, como a *Cascade*, *Saaz* e *Spalt*. De todos estes lúpulos resulta o sabor amargo, porém as diferentes variedades de lúpulo conferem subtilezas de sabor e, desta forma, através de diferentes proporções e combinações entre lúpulos, poderão ser obtidos produtos finais distintos (Healey, 2016).

O lúpulo no mundo cervejeiro é facilmente comparado às uvas na produção de vinho, dado que a temperatura de cultivo, o tipo de solo, a humidade, entre outras condições climatéricas também afetam o seu crescimento e, conseqüentemente, o sabor no produto final. De forma a manter a consistência do sabor da cerveja de produção para produção, os produtores ajustam as misturas de diversos lúpulos utilizados, de forma a colmatar qualquer variação sazonal que possa existir (Barth, 2013).

2.2.2.4. Levedura

As leveduras são fundamentais durante a produção de cerveja, devido à sua capacidade de converter os açúcares presentes no mosto em álcool e dióxido de carbono, entre outros metabolitos resultantes do processo de fermentação (Priest & Stewart, 2006).

Para selecionar o género, espécie e estirpe da levedura para produção de qualquer bebida alcoólica, é necessário ter em consideração o substrato que este organismo irá converter e ainda assegurar a viabilidade e inoculação das leveduras, de modo a evitar possíveis contaminações. Além disso, para o crescimento das leveduras e, conseqüente fermentação, devem-se assegurar as condições físico-químicas ideais do mosto (Quain, 2006).

As leveduras cervejeiras pertencem à família *Saccharomycetaceae* e ao género *Saccharomyces*, sendo que a estirpe e espécie utilizadas na fermentação ditam a origem de diferentes grandes grupos de cervejas. Esta distinção pode ser classificada em três tipos de cerveja, sendo elas: *ale*, *lager* e *lambic*.

As *ale* utilizam a estirpe *Saccharomyces cerevisiae*, uma levedura de alta fermentação (18-21 °C). Estas leveduras fermentam e consomem o perfil correto de açúcares, toleram níveis moderados de álcool e sobrevivem às condições anaeróbias da fermentação (Zainasheff & White, 2019). Após a fermentação, estes organismos floculam no topo do fermentador. Desta fermentação resultam cervejas escuras e com aromas fortes, como é caso das cervejas *porters*, *stouts* e também as cervejas ricas em trigo como a *Weissbier* (Callejo et al., 2017).

Já as *lagers*, utilizam a estirpe *Saccharomyces pastorianus*, uma levedura de baixa fermentação (10-13 °C) e com um período de fermentação superior ao das *ales*. Após a fermentação, as leveduras sedimentam no fundo do fermentador. Alguns exemplos de estilos de cerveja que utilizam esta estirpe são: *pilsners*, *bocks*, *märzen* e *dortmunders*, sendo as duas primeiras as mais consumidas pelos portugueses (Callejo et al., 2017).

Relativamente às *lambic*, este grupo de cervejas resulta da atuação de leveduras *Saccharomyces* e da *Brettanomyces bruxellensis* em diferentes fases de fermentação. Esta última estirpe tem a capacidade de fermentar em condições de aerobiose, permitindo, aquando da exposição

do mosto ao ar, a formação de um biofilme à superfície que contém bactérias lácticas e acéticas. Desta fermentação resulta um produto final com um perfil sensorial característico muito amargo (Callejo et al., 2017).

Assim, a escolha e manutenção da levedura no processo de produção de cerveja tem repercussões, uma vez que auxiliará à obtenção de aroma e *flavour* no produto final.

2.2.3. Processo de fabrico da cerveja

De um modo sucinto, o processo produtivo da cerveja é composto por diversas etapas, sendo estas: maltagem, brassagem, fermentação, maturação e enchimento. Cada uma das etapas é responsável por providenciar uma maior eficácia do rendimento do processo seguinte, de modo a obter-se um produto final de qualidade. As etapas referidas encontram-se esquematizadas na Figura 5.

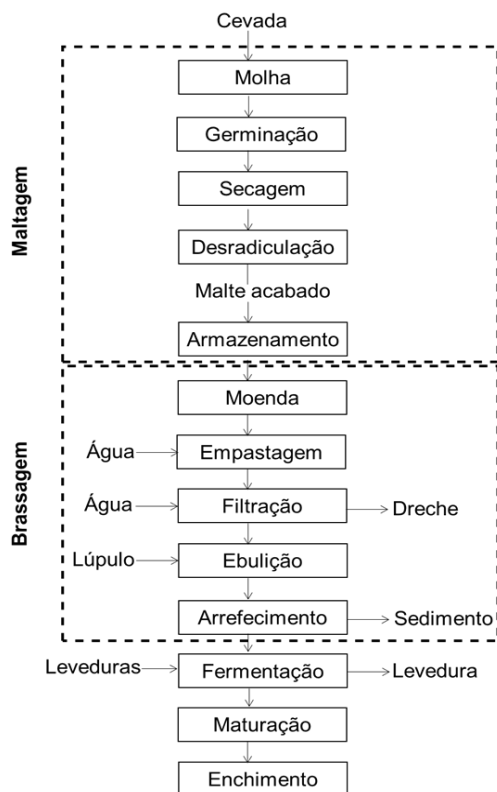


Figura 5: Diagrama do processo produtivo de cerveja. Elaboração própria.

2.2.3.1. Maltagem

A cevada, mesmo sendo o cereal mais apropriado para a produção de cerveja devido às suas características físico-químicas (como a dimensão e o maior conteúdo de amido), não está apta na sua forma natural para ser submetida ao processo de moagem e, conseqüentemente, prosseguir para o restante processo de fabrico. Desta forma, os grãos de cevada são sujeitos ao processo designado por maltagem, que transformará a cevada em malte.

O processo de maltagem tem como grande objetivo transformar os grãos de cevada a nível físico e químico, promovendo a produção e ativação de enzimas essenciais para os processos seguintes. Este processo, esquematizado na Figura 6, engloba três etapas principais: molha dos grãos de cevada, germinação e secagem (Eaton, 2017).

Este processo é realizado em malterias, sendo por isso independente das instalações de fabrico de cerveja. Em Portugal, a Sociedade Central de Cervejas e Bebidas S.A, é a única produtora de cervejas que inclui uma malteria, enquanto outras empresas obtêm logo o malte para iniciar o processo de fabrico desta bebida.

Antes da realização do processo de maltagem à escala industrial é simulada uma micromaltagem, que consiste na recriação de todos os processos da maltagem à escala laboratorial, onde ocorre a avaliação das aptidões da cevada sujeita aos processos que ocorrem na maltagem. A Figura 6 demonstra os processos que estão incluídos na maltagem dos cereais.

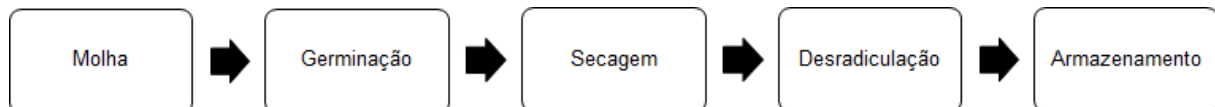


Figura 6: Diagrama do processo de maltagem. Elaboração própria.

2.2.3.1.1. Molha

A molha é uma etapa que permite aumentar a hidratação das sementes dos grãos, de forma a promover a germinação das mesmas. Primeiramente, são analisados vários parâmetros como o calibre dos grãos, o teor de humidade e o tipo de variedade de cevada em causa e, consoante a análise, são regularizados os termos para se proceder a este método (Kreisz, 2009). Esta etapa ocorre em tinhas de molha, onde a cevada é imersa em água, a temperatura controlada (entre 12 e 18 °C), promovendo o aumento de humidade do grão, bem como a solubilização e desagregação do endosperma (Kreisz, 2009).

Em períodos intercalares e de maneira a evitar a metabolização das reservas por anaerobiose, a água é drenada e ocorre o arejamento da cevada com recurso a ventiladores. Este arejamento também é controlado para evitar possíveis germinações precoces. Além disso, esta etapa funciona ainda como limpeza dos grãos, sendo que as impurezas que estão agregadas ao cereal serão eliminadas durante o escoamento da água. No final da molha, o grão já hidratado possui um volume cerca de 1,4 vezes superior ao volume original (Kreisz, 2009).

2.2.3.1.2. Germinação

Obtida a humidade desejada dos grãos nos tanques de molha, estes são direcionados para as caixas de germinação (Mallet, 2014). Esta etapa tem como objetivos produzir e ativar uma quantidade significativa de enzimas hidrolíticas, que auxiliam na quebra controlada da matriz proteica, bem como das paredes celulares, promovendo a friabilidade dos grãos para a moenda e facilitando o acesso ao amido, fonte de energia do grão (Kreisz, 2009).

À medida que a cevada germina, ocorrem uma série de alterações bioquímicas no núcleo que afetam a sua composição e estrutura (Mallet, 2014). É no embrião que se iniciam as modificações enzimáticas, prolongando-se para a restante estrutura do grão. A água que entra no grão dissolve o ácido giberélico (hormona responsável pelo crescimento vegetal) que induz a síntese da α -amilase. Esta enzima, juntamente com a β -amilase, catalisam o amido, sendo que os açúcares daí resultantes são transportados para o embrião, possibilitando o crescimento da pluma e radículas (Mallet, 2014).

A avaliação visual das plumas e radículas no exterior do grão, assim como a avaliação táctil da percepção de uma maior friabilidade do grão, são indicadores que determinam a interrupção desta etapa.

Estes objetivos são alcançados mediante o controlo dos parâmetros: temperatura (12 a 20 °C), tempo de germinação (4 a 5 dias), humidade (42 a 48%), arejamento (razão entre oxigénio e dióxido de carbono) e ainda a quantidade presente de ácido giberélico (entre 0,01 e 0,5 ppm) (Kreisz, 2009).

Após a interrupção da germinação, dada a ativação das enzimas e a desagregação desejada do endosperma, obtém-se o designado malte verde que estará pronto para ser submetido a uma secagem para impedir contaminação por microrganismos ou outros tipos de deterioração (Kreisz, 2009).

2.2.3.1.3. Secagem

A secagem do malte é a última etapa principal da maltagem, sendo, portanto, a transformação do malte verde em malte seco, matéria prima pronta a ser utilizada na produção de cerveja (Mallet, 2014).

Os objetivos inerentes a esta etapa são: erradicar qualquer possibilidade de germinação; baixar a humidade para níveis adequados de segurança do produto para armazenamento e, conseqüentemente, reduzir o peso para facilitar o transporte; interromper e conservar os complexos enzimáticos desenvolvidos nas etapas anteriores da maltagem (obtendo o potencial enzimático final do malte seco); desenvolver características sensoriais do malte (cor, sabor e aroma), bem como remover aromas indesejáveis e secar as radículas a fim de facilitar a remoção das mesmas (Mallet, 2014).

Tal como nas etapas anteriores, este método baseia-se no controlo dos parâmetros, como humidade, tempo e temperatura. Estes parâmetros irão definir o produto final, o malte, com as características e qualidade desejadas. Através destes parâmetros, juntamente com o fluxo de ar e o grau de modificação do malte, é possível obter diversos tipos de malte devido às reações de *Maillard* e do desenvolvimento de melanoidina, compostos estes determinantes para o desenvolvimento da cor, aroma e sabor da cerveja (Mallet, 2014).

A operação de secagem do malte pode ser dividida em duas fases. A primeira fase de secagem consiste na deslocação da água líquida que se encontra encapsulada no grão para a superfície, evaporando através do fluxo de ar quente e seco que atravessa os grãos de malte. Este fluxo, com temperaturas entre os 50 °C e os 65 °C, arrefece e satura quando removida a humidade dos grãos. Esta fase termina ao fim de 10 a 12 horas, quando o fluxo de ar deixar de arrefecer, o que quer dizer que já não há humidade a ser transferida (Kreisz, 2009).

Já a segunda fase constitui o aumento da temperatura dos fluxos de ar, desenvolvendo a cor e aroma do malte. Se a etapa da secagem não fosse um processo gradual e se o malte fosse sujeito de imediato a temperaturas muito altas (entre 77 a 110 °C, consoante o tipo de malte a produzir), haveria uma destruição significativa da atividade enzimática, relevante para etapas futuras, com o desenvolvimento de sabores e aromas indesejados e o malte tornar-se-ia muito duro devido à gelatinização do amido, ficando num estado vítreo (Mallet, 2014).

2.2.3.1.4. Desradiculação

Após a secagem, o malte deve ser limpo e arrefecido. As radículas que representam cerca de 3 a 5% do malte não podem ser utilizadas no processo de fabrico de cerveja, pois podem incitar a absorção descontrolada de água do malte (Kreisz, 2009). A desradiculação serve para remover as radículas, uma vez que estas também contêm compostos azotados e fenólicos significativamente elevados que prejudicam as características organoléticas da cerveja (Mallet, 2014).

O malte seco é direcionado para um tambor rotativo que separa e remove as radículas do malte. Se se mantivessem as radículas, dariam um sabor amargo e adstringente ao produto final. As radículas, ainda que sejam um produto sem vantagens para o processo de fabrico da cerveja, podem ser vendidas para alimentação animal (Kreisz, 2009).

2.2.3.1.5. Armazenamento

O malte recém processado não deve ser utilizado, primeiramente deve ser armazenado durante pelo menos três semanas após a secagem. Este malte teria um mau desempenho relativamente à produção de cerveja, devido à distribuição desigual da humidade do lote e à lenta recuperação das capacidades enzimáticas (Mallet, 2014).

Assim, o malte é limpo por peneiração e crivagem e é direcionado para os silos de armazenamento, onde será sujeito a temperatura e humidade controladas (armazenamento a frio e seco), de modo a evitar uma hidratação inadequada e o crescimento microbiano que degradaria o grão. Durante o armazenamento ocorre a estabilização da humidade do lote, que facilitará as etapas da brassagem (Mallet, 2014).

Após o armazenamento adequado, é possível conservar a qualidade do malte durante vários meses até à expedição do mesmo. Antes da expedição, os lotes de malte são misturados e polidos dependendo das necessidades de cada cliente. Além do polimento, também é efetuada a remoção de pó, controlo magnético e remoção de grãos partidos (Kreisz, 2009).

2.2.3.1.6. Torra

A torra é um processo que define o tipo de malte e que o direciona para o tipo de cerveja que se pretende produzir. Este processo realiza-se num torrador, onde os grãos de malte são sujeitos a temperaturas elevadas, ocorrendo reações de *Maillard*. Esta reação não-enzimática permite acentuar a cor, aroma e *flavour* do malte e da cerveja.

2.2.3.2. Brassagem

A brassagem é o culminar de diversas operações unitárias, nomeadamente a moenda, empastagem, filtração do mosto, ebulição, arrefecimento e clarificação do mosto. Estas operações encontram-se esquematizadas na Figura 7.

Este processo é essencial, uma vez que consiste num conjunto de reações químicas derivadas da extração dos açúcares presentes no malte para a água quente, resultando no designado mosto, onde estes compostos são imprescindíveis para o processo fermentativo.

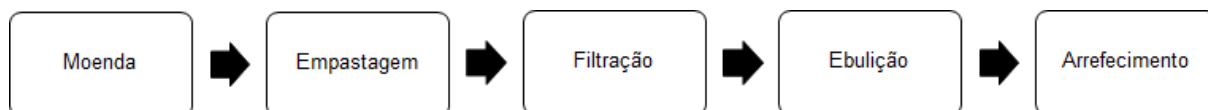


Figura 7: Diagrama do Processo de Brassagem. Elaboração própria.

2.2.3.2.1. Moenda

A moenda é a primeira etapa da brassagem. Trata-se de um processo mecânico onde ocorre a quebra controlada da casca dos grãos de malte, expondo e desintegrando o endosperma. Esta desintegração permitirá facilitar a extração e conversão dos constituintes presentes no endosperma durante o passo seguinte do processo, a empastagem (Barth, 2013).

Assim, consoante a granulometria desejada, o malte é moído com recurso a moinhos de rodas ou de martelos, transformando o malte em material farináceo. Porém, a moenda em demasia proporcionará a turvação da cerveja, devido à existência de partículas em suspensão (Barth, 2013).

Os parâmetros obtidos durante processo de maltagem, como uma maior friabilidade e poder diastático, auxiliam na solubilização e hidrólise do amido na etapa da brassagem (Barth, 2013).

2.2.3.2.2. Empastagem

Após a moenda do malte segue-se o processo de empastagem. A empastagem é a etapa onde ocorre a solubilização do malte moído em água quente. Corresponde à maximização da conversão da fração amilácea (que inclui amido, proteínas e gorduras) em açúcares fermentescíveis (glucose, maltose e maltotriose), dextrinas, vitaminas, aminoácidos e minerais. Esta solução rica nos compostos enunciados denomina-se por mosto (Eßlinger, 2009).

Nesta etapa são realizados vários binômios tempo/temperatura, consoante as diferentes temperaturas ótimas de ativação das enzimas, de forma a produzir um mosto com as características desejadas. Independentemente do estilo de cerveja, existem quatro patamares de temperaturas, cada uma com um objetivo específico. A Tabela 2 lista os diferentes patamares, com as temperaturas de ativação das enzimas com maior interesse na formação do mosto, bem como os produtos finais que por elas são convertidos, respetivamente (Eßlinger, 2009).

Tabela 2: Principais enzimas que atuam no processo de empastagem. (Adaptado de: Eßlinger, 2009).

Patamares	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo	Enzima ativada	Temperatura de inativação (°C)	Produtos finais
1.º	40 – 45	4,5 – 5	β -glucanases	55	Glucose, gluco-oligossacáridos
2.º	45 – 50	5 – 5,5	Proteinases	55	Péptidos com baixo peso molecular e aminoácidos
3.º	60 – 65	5,4 – 5,6	β -amilase	70	Maltose
4.º	70 – 75	5,5 – 5,8	α -amilase	80	Glucose, maltotriose, dextrinas e oligossacáridos

No primeiro patamar (40-45 °C), com a diminuição do pH, ocorre a aceleração da atividade enzimática, onde as β -glucanases serão responsáveis por degradar os β -glucanos; no segundo patamar (45-50 °C) decorre a ativação das enzimas proteolíticas; na terceira gama de temperaturas (60-65 °C), por ação da β -amilase há quebra de ligações, libertando a maltose (dímero); já na última série de temperaturas (70-75 °C), a enzima α -amilase é responsável pela disponibilização de glucose, maltotriose, entre outros açúcares (Eßlinger, 2009).

A atividade enzimática termina quando o mosto é aquecido a 78 °C, permitindo a estabilização dos açúcares fermentescíveis. É também a esta temperatura que a viscosidade do mosto é reduzida, melhorando a fluidez que, conseqüentemente, facilita a filtração desta empastagem (Eßlinger, 2009).

O tempo decorrido em cada patamar é determinante, na medida em que resulta em diferentes perfis de cerveja (Eßlinger, 2009).

2.2.3.2.3. Filtração do mosto (*sparging*)

Dada por terminada a transferência e a conversão dos compostos presentes no malte para a água, resultando um mosto rico em açúcares fermentescíveis, segue-se a etapa da filtração. Esta consiste na separação sólida-líquida, cuja solução líquida é o mosto açucarado e a fração sólida, designada por dreche, corresponde à solução insolúvel dos grãos de malte demolhados (Eßlinger, 2009).

O *sparging* é um termo conhecido na indústria cervejeira, que consiste no aumento eficaz de extração de açúcares ainda presentes nos grãos de malte. Este método baseia-se na lavagem dos materiais insolúveis, cuja água de lavagem se encontra à temperatura de interrupção da atividade enzimática do processo de empastagem, isto é, a 78 °C. Após a separação do extrato, inclusive o escoamento da água do *sparging*, do material insolúvel, termina esta etapa (Eßlinger, 2009).

O dreche, agora eliminado do processo de fabrico de cerveja, é vendido para alimentação animal, nomeadamente para complementar ração de bovinos de carne, vacas leiteiras e ainda aves (Priest & Stewart, 2006).

2.2.3.2.4. Ebulição do mosto

Nesta etapa, como o nome indica, decorre a ebulição do mosto, a uma temperatura ligeiramente superior a 100 °C, num período entre 30 a 120 minutos (Priest & Stewart, 2006). É durante a ebulição que são adicionados os lúpulos de amargor e aroma onde, como explicado anteriormente, os lúpulos de amargor são adicionados na fase inicial da ebulição, enquanto os de aroma são apenas adicionados perto do final da ebulição, devido aos compostos voláteis presentes (Eaton, 2017).

A ebulição tem como objetivos:

- Esterilizar o mosto, de maneira a eliminar possíveis microrganismos presentes que possam competir com a levedura durante a fermentação, suscetíveis de causar sabores e aromas indesejados, provocando a instabilidade do produto final;
- Extrair compostos amargos dos lúpulos adicionados precocemente à fervura, bem como extrair óleos e compostos aromáticos da adição tardia de lúpulo no mosto;
- Coagular o excesso de proteínas e taninos, resultando numa partícula sólida (o *trub*);
- Desenvolver cor e sabor do mosto;
- Remover substâncias voláteis indesejadas por evaporação;
- Concentrar os açúcares com evaporação da água do mosto (Eaton, 2017).

2.2.3.2.5. Arrefecimento e Clarificação (*whirpool*)

O mosto agora lupulado, para que seja possível proceder à inoculação da levedura, é arrefecido através de um permutador de placas, onde o mosto quente flui em tubos ou entre placas, enquanto o fluido de arrefecimento passa do lado oposto do mosto (Barth, 2013).

A temperatura de arrefecimento do mosto depende do tipo de fermentação que decorrerá no fabrico de cerveja. Assim, para as cervejas do tipo *ale*, a temperatura do mosto deve ser entre 18 °C e 25 °C, enquanto para as de tipo *lager* atingem-se temperaturas entre 8 °C e 12 °C (Eaton, 2017).

Simultaneamente ao arrefecimento, ocorre a clarificação do mosto (*whirpool*) que consiste na extração de fragmentos de lúpulo e de sedimentos (*trub*) por sedimentação, filtração ou centrifugação. Estes componentes, caso continuassem presentes, iriam destabilizar a fermentação por parte das leveduras adicionadas no passo seguinte do processo.

Ainda nesta etapa, e após o arrefecimento, o mosto é arejado com ar esterilizado, de modo a facilitar o desenvolvimento inicial da levedura, favorecendo a fermentação (Priest & Stewart, 2006).

2.2.3.3. Fermentação

Posteriormente ao arrefecimento e clarificação do mosto lupulado é iniciado o processo de fermentação. A fermentação é o processo que permite a conversão do mosto em cerveja, sendo este iniciado pelo designado *pitching*, consistindo na inoculação do mosto com uma concentração de cerca de 5×10^6 células de levedura por mL de mosto, para que ocorra o crescimento das leveduras. Além da

concentração de inóculo, é necessário promover condições específicas, tais como: o arejamento do mosto anteriormente efetuado, a temperatura e pH do meio (Hutkins, 2006).

A utilização das estirpes *Saccharomyces* na fermentação baseia-se em três características fundamentais: a utilização da fermentação como via metabólica preferencial combinada com o efeito *crabtree* (explicado mais adiante), a produção eficiente de quantidades relativamente elevadas de etanol, assim como maior a capacidade de tolerância ao etanol e outras pressões ambientais do meio (Callejo et al., 2017).

Na primeira fase de fermentação, as leveduras sintetizam sistemas de transportes de açúcar e aminoácidos, bem como enzimas necessárias para o metabolismo. Uma vez que o mosto é altamente aeróbico, devido ao arejamento, é estimulada a síntese de esteróis essenciais para a formação de membranas de células de leveduras, bem como de ácidos gordos insaturados que conferem fluidez às membranas, incitando o crescimento das leveduras no meio de cultura (Hutkins, 2006).

Após a fase de latência (fase *lag*), as células entram em fase de crescimento exponencial, iniciando-se a fermentação alcoólica primária.

Apesar das condições aeróbias levarem a que as leveduras *Saccharomyces*, anaeróbias facultativas, se reproduzam por via respiratória, pelo ciclo de *Krebs* (processo eficiente que produz 36 moléculas de ATP por glucose), uma vez que a concentração de glucose é elevada (1% ou 50 mM), em vez disso estas optam pela via metabólica fermentativa (com produção de apenas 2 moléculas de ATP por glucose). Este efeito, denominado por *crabtree*, ao ativar a via glicolítica, as enzimas envolvidas no ciclo de *Krebs* são reprimidas, acabando por ser inibida a via metabólica respiratória.

O metabolismo dos monossacáridos não ocorre de um modo simultâneo, isto é, primeiramente a glucose é consumida (entre um a dois dias) e só depois ocorre a expressão do gene α -glucosidade da codificação da hidrólise de maltose e maltotriose (Hutkins, 2006).

O metabolismo dos monossacáridos presentes no mosto resulta, essencialmente, em ácido pirúvico e NADH reduzido. O piruvato transforma-se em piruvato decarboxilase, dando origem a CO₂ e acetaldeído. Este último é ainda reduzido por álcool desidrogenase, originando etanol e NAD reoxidante. Esta reoxidação requer uma fonte alternativa de aceitadores de eletrões formando glicerol, álcoois superiores, ésteres, aldeídos, fenólicos, entre outros compostos orgânicos que contribuem para a qualidade da cerveja (Hutkins, 2006).

Nas cervejas do tipo *ales*, a fase de crescimento logarítmico tem um período de entre dois a três dias, enquanto para as *lagers* este perdura entre seis e sete dias. No final desta fase os monossacáridos e dissacáridos terão sido fermentados (Hutkins, 2006).

Durante a fermentação ocorre o decréscimo de pH, sendo que o mosto apresenta um pH entre 5,4 e 5,6, ao passo que no final desta etapa atinge valores entre 4,3 e 4,6, permanecendo depois constante. A diminuição do pH durante a fermentação tem ainda uma relação direta com o efeito do sabor ácido, bem como na vivacidade (cintilação) da cerveja (Eßlinger, 2009).

Uma fermentação rápida é vantajosa, uma vez que ocorre a precipitação dos polifenóis, o que facilitará a filtração, promovendo uma maturação mais célere, resultando numa cerveja com boa estabilidade. Devem ainda ser evitados valores de pH abaixo do intervalo anteriormente referido, pois

prejudicam o sabor ácido da cerveja, assim como devem ser evitados pH superiores ao intervalo, porque poderá ocorrer a autólise da levedura (Eßlinger, 2009).

A fermentação alcoólica é exotérmica, pois gera energia, libertando calor. Posto isto, os tanques de fermentação devem ser refrigerados com recurso a serpentinas de arrefecimento interno ou camisas externas, sendo que estes devem ser mantidos a uma temperatura entre 15 a 25 °C para cervejas tipo *ale* e entre 8 °C e 15 °C para tipo *lager* (Hutkins, 2006).

Durante a fermentação nas cervejas tipo *ale* é possível observar-se a levedura juntamente com o CO₂ gerado no topo do fermentador, sendo possível retirá-la e reutilizar numa nova fermentação. Já nas cervejas tipo *lager*, estas células permanecem suspensas, porém observa-se uma camada espessa composta de CO₂ com uma disposição idêntica a uma couve-flor. Na gíria cervejeira esta camada designa-se por *krausen*, em que à medida que o crescimento e a formação de CO₂ atinge o máximo, a camada pode ser retirada e utilizada para a segunda fermentação ou maturação da cerveja (Hutkins, 2006).

Como referido, o final da fermentação pode ser monitorizado pela observação de formação de CO₂, no entanto o método preferido é o peso específico, expresso em graus Plato. Consoante o consumo dos açúcares fermentescíveis por parte das leveduras, o grau Plato diminui, quando esta medida estabiliza subentende-se que já não haverão açúcares a serem consumidos e que a fermentação está completa (Hutkins, 2006).

2.2.3.4. Maturação

No processo de maturação pretende-se transformar a designada “cerveja verde” em cerveja maturada, pronta a ser embalada e consumida (Eaton, 2017). Esta etapa baseia-se no repouso, de modo a torná-la num produto microbiológico, físico e sensorialmente estável. A maturação envolve uma diminuição de temperatura que permite a clarificação, por precipitação da levedura e outros sedimentos presentes (Eaton, 2017).

De forma a melhorar o *flavour* e o aroma da cerveja, a maturação, também considerada como segunda fermentação, resulta no acerto da concentração de compostos indesejáveis do produto final. Além deste ajustamento, ocorre ainda o controlo do nível de carbonatação, através da injeção de CO₂ diretamente na embalagem final (Eßlinger, 2009).

Já no fabrico artesanal, adiciona-se sacarose numa concentração específica, de maneira a promover a reativação do metabolito primário da levedura, produzindo assim CO₂ na concentração desejada, dando-se a segunda fermentação. Como na produção artesanal não ocorre a etapa da filtração e a segunda fermentação decorre no interior da garrafa, observa-se frequentemente algum depósito no fundo da embalagem (Eßlinger, 2009).

2.2.3.5. Filtração

Após a maturação ocorre a sedimentação dos materiais sólidos, como a levedura residual, entre outras substâncias em suspensão. Uma vez que os consumidores têm em grande consideração o aspeto visual do produto final, a cerveja, nesta etapa, é submetida a uma filtração através de um meio filtrante *kieselguhr* (Eßlinger, 2009).

Esta filtração é responsável por eliminar os materiais em suspensão que potenciam a turbidez e estabilizar o aspeto original e cristalino da cerveja, ou seja, prevenir possíveis alterações visuais da cerveja ao longo do tempo (Eßlinger, 2009).

2.2.3.6. Enchimento

Como etapa final do processo de fabrico da cerveja surge o enchimento. Primeiramente, a cerveja é submetida a uma injeção de dióxido de carbono, que tem como intuito monitorizar e estabilizar a carbonatação, permitindo a obtenção da espuma característica da cerveja (Eaton, 2017). Também é nesta etapa que ocorre a pasteurização, que tem como papel principal assegurar a estabilidade sensorial, bem como microbiológica. Esta pasteurização poderá ser antes (por pasteurização *flash*) ou depois do engarrafamento (ocorrendo num túnel de pasteurização) (Eßlinger, 2009).

O enchimento pode ocorrer de diversas formas: garrafas (retornáveis ou não retornáveis), latas ou ainda barris. As garrafas são de vidro escuro para proteger a bebida da exposição à luz, que poderia potenciar reações que resultariam num perfil sensorial indesejado (Barth, 2013).

2.3. Microbiota da cerveja

Os microrganismos presentes nesta bebida têm um papel preponderante na produção de cerveja. Como referido anteriormente, as leveduras são uma matéria prima obrigatória, contudo está a ser estudado o impacto da presença de bactérias inseridos na fermentação em termos físico químicos e também sensoriais.

2.3.1. Leveduras

As estirpes de leveduras que foram desde muito cedo utilizadas no mundo cervejeiro pertencem ao género *Saccharomyces*. O estudo e familiarização com este género, de forma a ocorrer a fermentação da cerveja, deve-se às características fenotípicas que contêm, sendo estas: o facto de consumirem o perfil correto dos açúcares presentes no mosto, a utilização da via fermentativa como via metabólica preferencial com efeito de *crabtree* positivo associado, a consequente produção de grandes quantidades de etanol e a capacidade destes microrganismos tolerarem teores elevados de etanol, bem como stresses abióticos a que possam estar sujeitos durante a fermentação (Zainasheff & White, 2019).

Dentro do género *Saccharomyces* estão inseridas as duas espécies mais utilizadas na produção de cerveja, nomeadamente a *S. cerevisiae* e a *S. pastorianus*. Além destas estirpes encontram-se outras como as estirpes não-comerciais de *Saccharomyces* e as dos géneros não-*Saccharomyces*, sendo também vulgarmente reconhecidas como estirpes não convencionais, que têm sido alvo de estudo em termos físico químicos e sensoriais quando seleccionadas para a co-inoculação ou fermentação sequencial de cerveja.

2.3.1.1. Estirpes cervejeiras

De seguida apresenta-se uma tabela resumo das características fenotípicas e do desempenho das estirpes *S. cerevisiae* e *S. pastorianus* no processo fermentativo (Tabela 3).

Tabela 3: Características das Estirpes *Saccharomyces* (Zainasheff & White, 2019).

<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pastorianus</i>
Formato oval, cilíndrico ou elipsoidal com dimensões entre 2.5-4.5 x 10.5-20 µm.	Formato elipsoidal, globulosa ou cilíndrica com dimensões entre 2.2-8 x 3.5-13.5 µm.
Responsável pela produção de cervejas <i>ale</i> .	Responsável pela produção de cervejas <i>lager</i> .
Levedura de “alta fermentação”.	Levedura de “baixa fermentação”.
Temperatura de fermentação entre 18 e 25 °C.	Temperatura de fermentação entre 7 e 15 °C.
Tolera temperaturas até aos 34 °C.	Tolera temperaturas até 28 °C.
Processo fermentativo rápido.	Processo fermentativo mais demorado.
Não consome o dissacarídeo melibiose.	Boa assimilação da melibiose.
Consumo incompleto da maltotriose.	Consumo eficiente de maltotriose e, portanto, menor concentração de açúcares residuais no produto final.
Floculação da levedura no topo do fermentador no final da fermentação.	Deposição da levedura no fundo do fermentador no final da fermentação.
Perfil sensorial com notas frutadas.	Perfil aromático pobre, pouco aromático.

2.3.1.2. Papel das leveduras no perfil da cerveja

Além de ser o elemento chave da fermentação alcoólica, a levedura contribui, recorrendo às restantes matérias primas, para a produção e/ou conversão de compostos aromáticos e de *flavour* neste processo fermentativo (Pires et al., 2014).

Cada tipo de cerveja, quer pela estirpe selecionada, quer pelos parâmetros utilizados durante a fermentação, apresenta o seu próprio perfil sensorial. Os compostos principais produzidos pela levedura que determinarão a qualidade final da cerveja são: os álcoois superiores, ésteres e dicetonas vicinais (VDKs: Vicinal Diketones), sendo que este último componente contribui para a produção de sabores indesejados. O metabolismo da levedura promove ainda a produção de três grupos de componentes: ácidos orgânicos, compostos de enxofre e os aldeídos. Todos estes componentes ativos deverão estar presentes e coexistir de forma equilibrada, sendo que a predominância de um único grupo de compostos poderá destruir toda a experiência sensorial da cerveja (Pires et al., 2014).

Meilgaard, M.C., Dalgliesh, C.E. e Clapperton, J.F. criaram em 1979 a “Roda dos sabores”, onde estão registados os descritores mais recorrentemente associados ao aroma e sabor da cerveja. Na Figura 8 observa-se uma versão portuguesa adaptada da Roda dos Sabores. Ainda segundo Chris White, o impacto da levedura durante a fermentação contribui para cerca de 59% dos descritores de aroma e 79% dos descritores de *flavour* presentes nesta roda (Zainasheff & White, 2019).

carácter antimicrobiano, antibacteriano e ainda antifúngico auxiliam na estabilidade microbiológica dos produtos alimentares, minimizando os níveis de contaminação. Em seguida, estão descritos alguns destes metabolitos e a contribuição que têm na bio preservação dos produtos alimentares (Rouse & Van Sinderen, 2008).

O ácido láctico, ao baixar o pH do meio, torna menos propício o crescimento de determinadas espécies de patogénicos, incluindo *Salmonella*, *E.coli*, *Listeria monocytogenes* e a *Campylobacter jejuni*. As BAL heterofermentativas, devido à produção de CO₂, inibem o crescimento de micróbios aeróbios. Este produto metabólico também poderá ser comercialmente utilizado como conservante na embalagem do produto final. Já o diacetilo (2,3-butanidiona) é responsável por conferir um sabor semelhante a manteiga, bem como outros produtos derivados de laticínios. Além desse aspeto, também contém um efeito antibacteriano nomeadamente para *Listeria*, *Salmonella*, *E. coli*, *Yersinia* e a *Aeromonas*. Quanto ao peróxido de hidrogénio, que é produzido devido à presença de oxigénio, inibe o crescimento de microrganismos tais como *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* (Rouse & Van Sinderen, 2008). Além destas propriedades, existem outros metabolitos, como os aldeídos, ésteres e álcoois que são relevantes para o desenvolvimento de sabor e aroma (Dysvik et al., 2020).

O género *Lactobacillus* inserido nas BAL, contém espécies heterofermentativas (como a *L. acidophilus*), heterofermentativos obrigatório (*L. brevis*) ou heterofermentativa facultativas (*L. plantarum*). Este género tem a capacidade de ser utilizado em co-fermentações com leveduras na produção de variados produtos alimentares como o vinho, kefir, saké e cerveja (Dysvik et al., 2020).

Em geral, as bactérias lácticas possuem uma capacidade limitada de sintetizar e obter hidratos de carbono, péptidos e aminoácidos. O processo de fermentação efetuado por BAL, de forma a fomentar o crescimento das mesmas, necessita de várias etapas para a disponibilização destes nutrientes. Assim, estes microrganismos desenvolvem sistemas proteolíticos aptos a hidrolisar estes compostos presentes no meio. O processo de acidificação promove a ativação de certas enzimas, como as proteases, capazes de degradar as proteínas do glúten. Desta forma, a co-fermentação com bactérias lácticas é considerada um método para reduzir o teor de glúten dos produtos alimentares. Assim, além de facilitar a digestibilidade por parte dos consumidores sensíveis às proteínas constituintes do glúten, também proporciona efeitos benéficos na saúde intestinal (Peyer, 2017).

2.3.2.2. Papel das bactérias lácticas no perfil da cerveja

Os ingredientes constituintes da cerveja têm a sua própria microbiota. Assim, é importante seguir as boas práticas de higiene de modo a evitar a presença de microrganismos indesejáveis que comprometam a qualidade, a segurança e as propriedades organoléticas da cerveja (Rouse & Van Sinderen, 2008). A cerveja constitui um ambiente desfavorável para o crescimento da grande parte dos microrganismos devido a propriedades como: presença de etanol, baixo teor de oxigénio, esgotamento de nutrientes, alto teor de CO₂ e baixo pH. A adição de lúpulo na cerveja também possui um carácter antimicrobiano, porém alguns microrganismos resistem a este ambiente, nomeadamente as BAL (Rouse & Van Sinderen, 2008).

A acidificação é uma atividade das BAL que facilita o processo cervejeiro, uma vez que disponibiliza enzimas, como as amilases, no consumo do substrato. Posto isto, além da contribuição para reduzir o tempo de degradação do amido, também reduz a viscosidade do mosto, facilitando a etapa da filtração. A ação proteolítica resulta em cervejas menos turvas, uma vez que o teor proteico foi reduzido, resultando num produto final com uma espuma estável e com bolhas mais pequenas (Peyer, 2017).

Na produção de cerveja, tanto a estirpe *L. brevis* como a *L. plantarum*, quando em co-fermentação com a levedura *S. cerevisiae*, influenciam positivamente as propriedades organolépticas de formas distintas. Enquanto a *L. brevis* confere um sabor ácido e adstringente, a *L. plantarum* contribui para um aroma frutado e de frutos secos (Dysvik et al., 2020).

2.4. Diferentes estilos de cerveja

O estilo cervejeiro é a arte de combinar diversos fatores de forma a criar uma combinação consistente, conferindo uma boa qualidade ao produto final. Como observado nos processos a que as matérias primas estão sujeitas, a cerveja é o resultado de uma complexidade de reações que estão dependentes de diversas condições, que quando variadas originam uma panóplia de cervejas, cada uma com fortes singularidades.

É através do conhecimento das matérias primas, dos processos e do melhoramento das técnicas por parte dos produtores que se obtém cervejas com maior diferenciação, expandindo assim a diversidade cervejeira. Existem muitas variáveis que podem influenciar a perceção do sabor, aroma, cor, formação de espuma, o corpo da cerveja, entre outros aspetos, sendo estes: a utilização dos diferentes maltes, o tempo e temperatura a que foram sujeitos na etapa da torra, a dimensão do malte pós-moenda, a concentração de lúpulos e o momento em que foram adicionados na ebulição do mosto, o tipo de levedura (de baixa ou alta fermentação), assim como o tempo de fermentação e de maturação, e, por último, o equipamento utilizado (dimensão, forma, etc.). O fator geográfico e histórico também descreve e define os estilos de cerveja.

Na Tabela 4 estão apresentados os estilos mais reconhecidos no mundo cervejeiro, contendo a origem, o tipo de fermentação e uma breve descrição dos mesmos (Strong & England, 2015).

Tabela 4: Estilos de cerveja (Adaptado de: Strong & England, 2015).

Estilo de Cerveja	Origem	Tipo de Cerveja (Tipo de fermentação)	Breve descrição
Pilsner	República Checa	<i>Lager</i> (baixa fermentação)	Cor dourada, fresca e sabor suave. Bom equilíbrio entre o malte e os lúpulos. Estilo muito popular.
Dunkel	Alemanha	<i>Lager</i> (baixa fermentação)	Cerveja escura, adocicada e com notas de frutos secos e chocolate.
Dortmunder			Cor dourada, sabor adocicado do malte com forte amargor.
Bock			Castanho escuro forte, robusta e nutritiva, com notas de caramelo e pão tostado.
Helles			Versão mais pálida da <i>Dunkel</i> , com baixo amargor.
Weiss		<i>Ale</i> (alta fermentação)	Cerveja composta por, pelo menos, 50% de malte de trigo. Com notas de banana e espuma consistente.
Kölsch			Cor dourada, fortemente lupulada com paladar ácido/lático.
Bitter Ale	Reino Unido	<i>Ale</i> (alta fermentação)	Acastanhada pálida com sabor amargo.
Brown Ale			Cerveja acastanhada, podendo ser adocicada e pouco alcoólica ou mais amarga e torrada.
Indian Pale Ale			Muito lupulada, com aromas e sabores frutados, herbáceos ou florais, de cor dourada a acobreada.
Porter			Cerveja escura quase preta, mas menos encorpadas e mais doce que a <i>Stout</i> . Com notas de chocolate.
Stout			Cerveja preta, forte e encorpada. Maltes escuros e torrados. Com notas de café e chocolate preto.
Trappist	Abadias Belgas e Holandesas	<i>Ale</i> (alta fermentação)	Cor âmbar a castanha, com variações de intensidades aromáticas e de teor alcoólico.
Lambic	Bélgica	Fermentação espontânea	Cor clara, ácidas com sabor azedo, com aroma desde os frutados aos cítricos.
Gueze	Bélgica	Refermentação em garrafa	Mistura de <i>lambics</i> novas e envelhecidas. Cerveja com segunda fermentação em barris de carvalho, com sabor semelhante ao champanhe.

2.5. Mercado de cervejas sem glúten em Portugal

Inserindo a temática do glúten na indústria cervejeira, este advém das proteínas encontradas na cevada (*hordeína*), trigo (*glutenina*) e centeio (*secalina*) (Colgrave et al., 2017b).

No mercado mundial de cervejas sem glúten, existem diversas cervejas produzidas a partir de cereais que não contêm glúten, como é o caso do milho, arroz, sorgo e paíção, e algumas até com

recurso a pseudocereais, como o trigo mourisco. Porém, sensorialmente estas cervejas carecem do sabor e aroma característico desta bebida, que resulta da utilização da cevada maltada (Colgrave et al., 2017b).

Em Portugal, neste presente ano (2020), foi criada a primeira cerveja portuguesa certificada pela APC como sendo uma cerveja sem glúten. Além deste produto, existe um portal, o *GlutenZero*, que indica as marcas de cervejas estrangeiras que estão à venda nas grandes superfícies do país (Tabela 5).

Tabela 5: Mercado português de cervejas sem glúten.

Nome do produto (Marca)	Origem	Ingredientes	Método de redução de glúten
<i>Estrella Damm Daura (Grupo Damm)</i>	Espanha	Água, malte de cevada, arroz e lúpulo	Hidrólise de proteínas (produto com menos de 3 ppm de glúten)
<i>CELIA (Carlsberg Group)</i>	República Checa	Água, malte de cevada biológica, lúpulo biológico	Degradação enzimática e sistema de filtração de silicone; (CELIA retém menos de 5 ppm de glúten)
<i>Riedenburger Gluten Frei (Riedenburger Brauhaus)</i>	Alemanha	Água, malte de milho paíço e lúpulo.	Utilização de ingredientes isentos de glúten
<i>Mongozo Premium Pilsener (Mongozo beers)</i>	Bélgica	Água, malte de cevada, arroz e lúpulo	Degradação enzimática (contém menos de 10 ppm de glúten)
<i>Super Bock sem glúten (Super Bock Group)</i>	Portugal	Água, malte de cevada, cereais não maltados (milho e cevada) e lúpulo	Degradação enzimática (produto com menos de 5 ppm de glúten)
<i>Lammsbräu Glutenfrei (Neumarkter Lammsbräu)</i>	Alemanha	Água, malte de cevada e lúpulo	Sistema de filtração

2.6. Processo de redução do glúten na cerveja

A cerveja produzida com as matérias primas convencionais é considerada um produto tóxico celíaco, uma vez que contém malte à base de cevada ou de trigo. Desta forma, são impróprias para o consumo perante indivíduos com sensibilidade e intolerância ao glúten (Hager et al., 2014). A quantidade de glúten presente na cerveja depende dos tipos de cereais, bem como a proporção

utilizada e ainda da tecnologia aplicada, sendo que existem cervejas tratadas com valores inferiores a 20 ppm de glúten e cervejas, como as de trigo que segundo Comino *et. al* (2012), em 32 cervejas de trigo, 30 atingiram superiores a 100 ppm. Uma variação do estilo *Weissbier* e *Dunkel*, a *Dunkelweizen*, contém valores próximos de 196,4 ppm (Guerdrum & Bamforth, 2011).

As cervejas artesanais, comparativamente às industriais, possuem um elevado teor médio de glúten devido à falta de equipamentos de filtração e estabilização da cerveja. Assim, foram estudadas diversas técnicas que possibilitam a redução do teor de glúten presente nesta bebida, nomeadamente a precipitação, a hidrólise enzimática e a utilização de bactérias lácticas (Fanari *et al.*, 2018).

O próprio processamento da cerveja propicia a diminuição do teor de glúten. Durante a brassagem, os componentes constituintes do malte são solubilizados na água, sendo que a maioria das proteínas são precipitadas permanecendo no grão, enquanto outras são hidrolisadas em polipéptidos simples, passando para o mosto. No processo de ebulição ocorre a minimização do teor de glúten presente no mosto e, com o decorrer das fermentações, e a diminuição do pH, é promovida a precipitação de alguns polipéptidos, sendo que o conteúdo original de glúten no produto final que permanece na cerveja é muito reduzido (Hager *et al.*, 2014). Estudos verificam que a redução do glúten pode variar entre 46 e 79% desde o mosto até ao produto final (Colgrave *et al.*, 2017a).

Uma das formas de modificar e conseqüentemente reduzir o teor de glúten, diminuindo a DC imunoreatividade do produto alimentar, é através da degradação enzimática. Esta degradação e eliminação eficaz é responsável por peptidases provenientes de várias fontes: peptidases presentes nos grãos de cereais, peptidases fúngicas e/ou de bactérias lácticas e ainda por enzimas concebidas em laboratório. Estas peptidases são utilizadas durante o processamento que, ao degradar as proteínas do glúten em fragmentos inofensivos, originam produtos alimentares com teores de glúten abaixo do limiar permitido pelo *Codex Alimentarius*, tornando-os seguros para os indivíduos com sensibilidade e intolerância ao glúten (Scherf *et al.*, 2018). No esquema que se segue estão representadas algumas fontes de degradação enzimática (Figura 9).

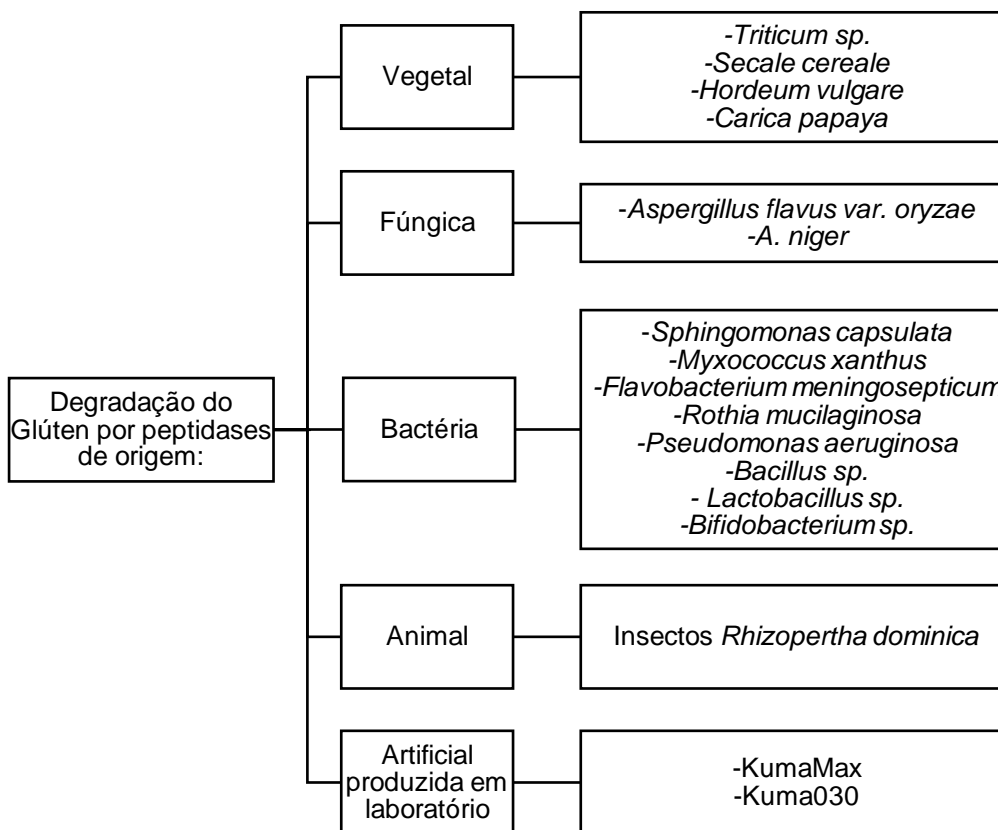


Figura 9: Fontes de degradação enzimática de glúten (Adaptado: Scherf et al., 2018).

Relativamente aos tratamentos enzimáticos, a enzima transglutaminase microbiana (TG) é frequentemente utilizada na degradação de glúten de alimentos e bebidas, onde propicia a precipitação destas proteínas, possibilitando a remoção das mesmas por filtração (Colgrave et al., 2017b).

A endopeptinase de prolil ou endopeptidase pós-prolina ou ainda prolil oligopeptidase, é uma enzima apta a hidrolisar ligações peptídicas que é utilizada para degradar sequências de péptidos com prolina, responsáveis pela doença celíaca. Estudos efetuados relatam que 100% das cervejas de malte de cevada, com adição desta enzima no decorrer da fermentação, resultam em cervejas com valores inferiores de glúten estipulados pelo *Codex Alimentarius*, sem comprometer a estabilidade da espuma (Hager et al., 2014).

Existem outros auxiliares para a estabilização da espuma da cerveja que também colaboram na remoção de glúten, como é o caso da polivinilpolipirrolidona (PVPP) e a sílica gel ou taninos condensados (Colgrave et al., 2017b). O gel de sílica é um derivado de dióxido de silício que, por adsorção física, possui uma grande afinidade para resíduos de prolina. Esta técnica desenvolve grandes bandas constituídas pelo conjunto deste composto com as proteínas que, posteriormente, são removidas por filtração ou por tratamentos de precipitação. A utilização desta técnica, ao remover as proteínas, pode dificultar o desempenho fermentativo da levedura, resultando numa instabilidade da formação da espuma e no perfil sensorial, potenciando o amargor (Fanari et al., 2018).

Outra abordagem alternativa é a utilização de bactérias durante o processamento dos produtos alimentares. Estes microrganismos possuem a capacidade de minimizar o risco associado à contaminação de produtos sem glúten, sendo que numa contaminação inicial com 400 ppm de glúten,

este foi reduzido para 20 ppm com recurso a estirpes de *Lactobacillus*, mais uma vez demonstrando que conseguem reduzir a contaminação para níveis inferiores aos estipulados. Para além disso, uma co-fermentação com bactérias lácticas, não só reduz a toxicidade em termos de glúten, como também complementa a cerveja com sabor e propriedades benéficas para a saúde do consumidor (Hager et al., 2014).

3. Materiais e métodos

3.1. Estirpes e matérias primas utilizadas

3.1.1. Estirpes de leveduras e bactérias

Para a realização deste estudo foram utilizadas as estirpes de leveduras e bactérias apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6: Estirpes de leveduras e bactérias utilizadas nos ensaios fermentativos.

	Estirpe	Proveniência	Temperatura de fermentação (°C)
Levedura	<i>S. cerevisiae</i> Blanche	Brewferm	18-24
Bactéria	<i>Lactobacillus brevis</i>	ISA código 4281	25
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ISA código 4386	25

A levedura aplicada neste estudo foi adquirida na loja Oficina da Cerveja, tendo sido mantida a temperaturas de 4 °C antes da sua utilização. Esta foi plaqueada em meio YPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*) sólido (extrato de levedura 0,5% (m/v)). Antes da inoculação da levedura no mosto, preparou-se uma suspensão de células em meio YPD líquido, (Extrato de levedura 0,5% (m/v); peptona 1% (m/v); glucose 2% (m/v)), com a inoculação de uma ansa das colónias formadas em meio sólido. Esta solução foi incubada a 28 °C com agitação orbital de 150 rpm, durante 24-48 h até à leitura da densidade ótica (DO_{640nm}) para posteriormente ser inoculada no mosto.

Relativamente às BAL, estas foram adquiridas através do banco de bactérias do ISA, cultivadas em tubos de ensaio, em meio MRS (*De Man, Rugosa and Sharpe*) líquido. Até serem utilizadas, foram incubadas na estufa de cultura à temperatura de 28 °C, sendo refrescadas em meio MRS novo até à leitura da DO_{640nm} para posteriormente se proceder à inoculação das BAL no mosto.

3.1.2. Malte

O malte utilizado na preparação do mosto de cerveja do estilo *Weissbier* foi obtido na empresa *LX Brewery, Lda.*, proveniente do fornecedor *Castle Malting* (Bélgica). Relativamente à moagem dos diversos maltes utilizados, foi realizada através do moinho *Piccolo 15 S 400 V* (*Sommer*, Alemanha).

3.1.3. Lúpulo

Os lúpulos foram obtidos igualmente na empresa *LX Brewery, Lda.*, proveniente do mesmo fornecedor (*Castle Malting*). Estes até serem utilizados no processo de brassagem foram mantidos em vácuo a -18 °C, de forma a evitar a volatilização dos aromas.

Na Tabela 7 estão presentes os maltes e os lúpulos que constituem o mosto da cerveja estudada, com as quantidades correspondentes de cada um. Além destas matérias primas, também está demonstrado o programa de brassagem efetuado.

Tabela 7: Receita para a obtenção do mosto da cerveja do estilo Weissbier.

Matérias primas do malte de Weissbier		Programa de brassagem	
Tipo de malte	Quantidade utilizada (g)	Fase de empastagem	
<i>Pilsner</i> (3,9 EBC)	2000	Duração (min)	Temperatura (°C)
Trigo (3,9 EBC)	2500	15	45
<i>Caramel</i> (39,4 EBC)	200	15	57
		40	67
		10	78
		Fase de ebulição -	
Tipos de lúpulo		Tempo de adição do lúpulo (min)	
Quantidade utilizada (g)		60	
<i>Hallertauer</i> <i>Hersbrucker</i>	20	20	
<i>Saaz</i>	15		

3.2. Ensaio fermentativos

O presente trabalho pretendeu avaliar o impacto das BAL na degradação do teor de glúten na cerveja à base de trigo, do estilo *Weissbier*. Como tal, e com o intuito de alcançar o objetivo deste estudo, foram executados três ensaios em duplicado. Os detalhes de cada ensaio são demonstrados na Tabela 8.

Tabela 8: Detalhes sobre os ensaios executados neste estudo.

Ensaio	Detalhe do ensaio
Controlo	Inoculação da levedura <i>S. cerevisiae Blanche</i> no mosto da cerveja <i>Weissbier</i> .
Fermentação Sequencial	Início da fermentação do mosto com inoculação das BAL <i>L. brevis</i> e <i>L. plantarum</i> e adição da levedura <i>S. cerevisiae Blanche</i> no terceiro dia de fermentação (48 horas após a inoculação das BAL).
Consórcio	Inoculação simultânea da levedura <i>S. cerevisiae Blanche</i> e das duas BAL no primeiro dia de fermentação.

Cada ensaio teve duração de oito dias e, de modo a obter mais tempos de análise, estes duplicados foram executados de forma desfasada com 12 horas de intervalo entre os duplicados.

3.2.1. Preparação do mosto

Para a produção de cerveja do estilo *Weissbier*, foram produzidos 20 L de mosto, com recurso ao equipamento *Braumeister* 20 L (*Speidel*, Alemanha), observado na Figura 10.



Figura 10: Equipamento *Braumeister* utilizado no processo de brassagem do mosto de cerveja. (Adaptado de: *Speidel*, 2020).

O volume total de água utilizado para o processo de brassagem foi de cerca de 20 L, sendo que 5 L foram utilizados para o *sparging* a 70 °C. De forma a que a água do mosto possuísse uma concentração de sais equilibrada, recorreu-se a água engarrafada da marca LUSO durante o processo de brassagem.

Após a fase de empastagem, procedeu-se à centrifugação do mosto com recurso de uma pá desinfetada, para que o sedimento formado na fase de ebulição se mantivesse no centro do equipamento.

Na etapa de ebulição, os lúpulos foram adicionados nos tempos descritos na Tabela 7. Posteriormente a esta fase, seguiu-se o processo de arrefecimento, onde, com auxílio de um arrefecedor em serpentina de aço inoxidável oco, se promoveu o fenómeno de arrefecimento do mosto para temperatura próxima de 25 °C. Já arrefecido, o mosto que se encontrava no equipamento foi vertido, a uma distância que permitisse a oxigenação do mosto, para dois frascos de *Schott* de um litro, enquanto o restante mosto foi guardado em garrações de plástico de 5 L e congelado a -80 °C para ensaios fermentativos posteriores.

3.2.2. Processo fermentativo do mosto

Todos os ensaios foram efetuados em duplicado, sendo que cada fermentação foi efetuada em frascos de *Schott* estéreis com capacidade de um litro, com recurso a um borbulhador adaptado, com álcool, de forma a evitar possíveis contaminações. Cada frasco possuía cerca de 900 mL de mosto, sendo que, consoante o ensaio executado, foi inoculado segundo os detalhes observáveis na Tabela 8. As fermentações decorreram num banho a temperatura controlada de 25 °C. Conforme os ensaios efetuados, estes frascos foram inoculados com as estirpes respetivas de cada ensaio. Cerca de uma

semana antes do ensaio decorrer, as estirpes foram preparadas, refrescadas em meio novo, para garantir que no primeiro dia de fermentação estivessem operacionais para iniciar o processo de fermentação do mosto.

Relativamente à quantificação da biomassa, para posterior cálculo do volume de inóculo necessário para cada frasco de *Schott*, procedeu-se à determinação da absorvância a 640nm, com o espectrofotómetro *Ultrospec2100pro* (*Amersham Biosciences*, Reino Unido). Sabendo que, para leveduras, 1 DO equivale a uma concentração próxima de $3,3 \times 10^7$ células levedura/mL, e que para as BAL este equivale a uma concentração aproximadamente de $2,5 \times 10^8$ células BAL/mL, determinou-se o volume a inocular de cada estirpe por forma a obter 1×10^6 células/mL em cada frasco de *Schott* com o mosto.

3.2.3. Engarrafamento e maturação

Após o processo de fermentação com duração de oito dias, a cerveja foi engarrafada em garrafas de vidro escuras e esterilizadas, com volume de 200 mL. Primeiramente, e de maneira a filtrar o material que depositou durante a fermentação (como impurezas e/ou leveduras), a cerveja verde dos frascos de *Schott* foi vertida cuidadosamente para um balão *Erlenmeyer* de um litro. Nesse balão foi ainda adicionada sacarose (açúcar branco da marca Continente), por forma a promover a carbonatação e a segunda fermentação em garrafa. A concentração adicionada foi cerca de 6 g_{açúcar}/L de cerveja verde. Já engarrafada, a cerveja foi maturada à temperatura ambiente (20 °C) durante 15 dias.

3.3. Análise microbiológica

Durante o processo fermentativo, houve um acompanhamento diário, recolhendo-se amostras para avaliação microbiológica, de forma a permitir observar o crescimento e evolução das estirpes nos ensaios executados.

A cada tempo de análise, e com a devida homogeneização das suspensões presentes nos frascos *Schott*, retiraram-se cerca de 10 mL de amostra para um tubo *ependorf* de 15 mL dentro da câmara de fluxo laminar, por forma a proceder-se à análise microbiológica e físico química.

3.3.1. Determinação do número de células viáveis e células totais

Com o propósito de acompanhar o crescimento das leveduras e posterior contagem utilizou-se o hemocitómetro.

Para esta análise, juntaram-se cerca de 25 µL de amostra ao reagente azul metileno (1:1). O mesmo foi realizado com a amostra diluída em água miliQ, cuja diluição foi 1:10. O reagente azul metileno tinge as células não-viáveis com uma coloração azul, sendo que as células incolores correspondem às células viáveis.

Assim, após o repouso da mistura durante 15 minutos, observou-se ao microscópio e foi feita a contagem das células viáveis e não-viáveis que se encontravam dispostas no interior da quadrícula central do hemocitómetro, constituída por 9 quadrados com igual tamanho, com um volume de $2,5 \times 10^{-4}$ mm³.

3.3.2. Determinação do número de células viáveis cultiváveis

A monitorização do crescimento das estirpes de levedura e das BAL presentes no mosto, com a garantia de que o número de colónias por placa estivesse compreendido entre 30 e 300 UFC (Unidade Formadora de Colónias), foi efetuada através de diluições da amostra com água miliQ até 10^{-6} .

O plaqueamento realizou-se em duplicado e foi efetuado por espalhamento à superfície com 100 μ L de suspensão. O meio YPD sólido foi utilizado para propiciar o crescimento da levedura, enquanto o meio MRS foi aplicado para as BAL. Finalizado o espalhamento, as placas foram incubadas à temperatura ambiente durante 72 horas. Após o crescimento realizou-se a contagem das UFC.

3.4. Análises dos parâmetros físico químicos

Em cada tempo deste estudo, além de se retirar amostra de 10 mL para um tubo para realizar as análises microbiológicas, esta mesma amostra foi ainda utilizada para realizar a análise físico química.

3.4.1. Determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix)

Com vista a acompanhar a quantidade de sólidos solúveis/açúcares, recorreu-se ao refratómetro HI 96801 ATC (*Hanna*, Inglaterra) para determinar o °Brix das amostras em estudo. Foram colocados cerca de 50 μ L de amostra no suporte de leitura do refratómetro, e apontando o aparelho para uma fonte luminosa tornou-se possível observar e efetuar a leitura. Para cada amostra efetuaram-se duas leituras, cujo resultado é a média respetiva das réplicas.

3.4.2. Determinação do pH

O pH do mosto, foi determinado com recurso a um elétrodo de pH (*Broadley James Corporation*, Inglaterra) acoplado ao potenciómetro pHM82. Antes de realizar a leitura das amostras, o elétrodo foi calibrado com duas soluções tampão da *Sigma-Aldrich*, EUA, de pH 4 e 7.

3.4.3. Determinação dos açúcares, etanol, glicerol e ácidos orgânicos

O acompanhamento do consumo de glucose nas amostras durante o processo fermentativo foi efetuado com recurso às tiras *Keto-Diabur-Test* 5000. Porém, esta análise foi apenas considerada como uma análise qualitativa, uma vez que é pouco precisa e suscita muitos erros. Assim, foi exclusivamente utilizada para detetar e interromper o ensaio perante um resultado que pudesse ser anómalo.

Para a determinação dos açúcares, e dos metabolitos de fermentação de forma mais precisa recorreu-se à análise por HPLC. Efetuou-se a recolha das amostras de forma idêntica às restantes análises microbiológicas, sendo que após a recolha estas foram diretamente congeladas até à realização da análise. Depois de descongeladas, as amostras foram agitadas no vortex e centrifugadas a 10000 xg durante 5 minutos, para remoção da biomassa celular. O sobrenadante foi diluído numa proporção de 1:10 em uma solução de ácido sulfúrico (50 mM). As amostras diluídas foram agitadas no vortex e centrifugadas a 10000 xg por 5 minutos, e os sobrenadantes obtidos filtrados usando filtros de seringa com 0,22 μ m de diâmetro de poro (*BGB-Analytic*, EUA).

As amostras foram analisadas em duplicados biológicos usando um sistema de HPLC da Waters, equipado com injetor automático (*Autosampler 717 plus, Waters*) e um detector de índice de refração (*Refractive Index Detector 2414, Waters*). Foi usada uma coluna de exclusão iônica Rezex™ ROA Organic Acid H+ (8%) (300 × 7,8 mm, *Phenomenex, Torrance, CA, USA*), para análise de açúcares, ácidos orgânicos e etanol. O forno da coluna foi mantido a 65 °C, e foi usada uma solução de ácido sulfúrico a 5 mM como fase móvel a um fluxo de 0,5 mL/min.

A determinação da concentração de cada um dos compostos foi realizada utilizando retas de calibração para glucose (*BDH*), maltose, maltotriose, glicerol, ácido málico, ácido cítrico (*Sigma-Aldrich*), etanol, ácido acético (*Merck*) e ácido láctico (*Fluka*) (Anexo I).

3.4.4. Determinação do amido

Com a finalidade de se estudar o consumo de amido ao longo da fermentação, fez-se a análise do mesmo, utilizando o método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) no início e no final da fermentação para cada ensaio. Para esta análise foi necessário preparar várias soluções: KOH (2 M), PBS (0,2 M com pH 6,9) e DNS, cuja preparação das mesmas está explicada em detalhe no Anexo II. As amostras foram centrifugadas a 10000 *xg* durante 5 minutos e foram realizadas análises ao amido presente no *pellet* e no sobrenadante de forma independente. Foi ainda realizada uma reta de calibração com soluções de glucose de concentrações conhecidas (Anexo II).

Na Figura 10 está demonstrado o esquema das diluições usadas para obter o sobrenadante e o *pellet* a ser usado para a determinação do teor de amido.

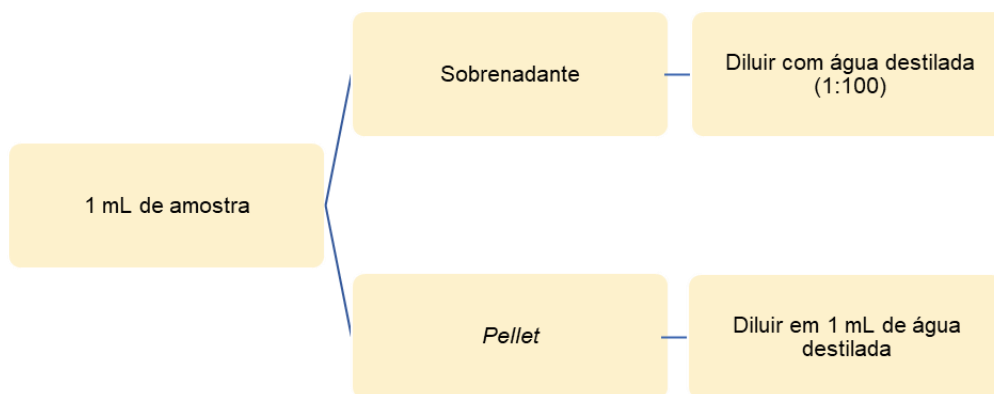


Figura 10: Esquema da diluição das amostras iniciais para usar na determinação do amido.

De cada amostra de *pellet* ou sobrenadante diluído de acordo com a Figura 10, foram recolhidos 400 µL de amostra e misturados com 400 µL da solução de KOH. Esta mistura foi mantida durante 30 minutos à temperatura ambiente e com agitação orbital a 220 rpm. Após este tempo a mistura foi dividida em duas frações de 200 µL da amostra anterior onde foram adicionados: (i) 1200 µL de PBS; ou (ii) 600 µL de PBS e 600 µL de uma solução de α-amilase (20 mg de α-amilase 2.5 MU da Sigma em 50 mL PBS). As misturas (i) e (ii) foram colocadas num banho agitado a 37 °C durante 45 minutos. Passado este tempo foram adicionados 400 µL de DNS às amostras e estas foram colocadas num banho com água a ferver durante 5 minutos, seguido de arrefecimento em gelo. Foi então adicionado 1,6 mL de água a cada amostra e a absorvância medida a 540 nm.

As concentrações de açúcar nas amostras foram determinadas usando a curva de calibração de glucose presente no Anexo II. Para cada amostra os valores obtidos para o respectivo *pellet* e sobrenadante foram somados no final dos cálculos. Os valores das concentrações de amido foram calculados por diferença entre as concentrações de glucose em amostras com presença (ii) e ausência (i) de α -amilase, e os mesmos multiplicados por um fator de 0,9 (Yong et al., 2019).

3.4.5. Determinação do teor de glúten

De modo a alcançar o objetivo do presente estudo, analisou-se o teor de glúten no início e no final da fermentação de cada ensaio para assim entender o impacto das BAL no processo de degradação do glúten durante a fermentação numa cerveja à base de trigo.

Esta análise foi realizada através de um kit comercial desenvolvido pela *R-Biopharm (Ridascreen Gliadin Competitive)*. Este teste ELISA competitivo é um método quantitativo, utilizado para analisar produtos fermentados e hidrolisados como cerveja, xarope de amido, extrato de malte e molho de soja. Este imunoensaio enzimático permite quantificar fragmentos de prolaminas de trigo, centeio e cevada.

Primeiramente foi necessário fazer uma solução com 60 mL etanol absoluto com 40 mL de água miliQ, contendo 10 g de gelatina líquida de peixe (SERVA). Esta foi bem homogeneizada com um ímã numa placa de agitação. Durante a agitação, foi efetuado um ajuste do pH, através do eletrodo de pH (*Broadley James Corporation*, Inglaterra) acoplado ao potenciômetro pH82, com recurso a uma solução concentrada de NaOH (*Merck*) para um pH final de 8,5.

As amostras dos ensaios encontravam-se congeladas, sendo que apenas no momento de executar esta análise estas foram descongeladas e agitadas no vórtex. Com recurso a uma micropipeta, retiraram-se 0,5 mL de cada amostra para um *ependorf* de 15 mL, onde foram misturadas com a solução de etanol numa diluição de 1:10 e novamente submetidas a agitação no vórtex. Desta mistura foi retirado 1 mL para um *ependorf* com capacidade de 1,5 mL, e posteriormente foram centrifugadas durante 10 minutos à velocidade máxima da centrífuga *Sigma 1-14 microfuge* e à temperatura ambiente (20 – 25 °C). Centrifugadas as soluções retirou-se 1 mL de sobrenadante.

Paralelamente a este procedimento foram preparadas outras soluções que se encontram no *kit*, tais como: a solução-tampão (1:5), o anticorpo (1:10) e a solução tampão de lavagem (1:10), todos à temperatura ambiente e diluídos com água *miliQ* na câmara de fluxo laminar.

O sobrenadante de cada amostra em estudo foi diluído de 1:4 com a solução-tampão preparada, onde foram retirados 10 μ L dessa mistura para ser novamente submetida a uma diluição com a mesma solução-tampão de 1:50. Posteriormente colocou-se com auxílio de uma micropipeta 50 μ L desta mistura nos poços da microplaca em duplicado, adicionando também 50 μ L da solução preparada com anticorpo em cada poço. Aquando dos poços preenchidos, a microplaca foi incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos sob uma suave agitação. Na microplaca para além de estarem as soluções com as amostras em estudo, também foram colocadas em poços independentes soluções-padrão prontas a utilizar. Estas soluções-padrão contêm hidrolisado de trigo e prolaminas de

cevada com concentrações conhecidas, são elas: 0 ng/mL, 10 ng/mL, 30 ng/mL, 90 ng/mL e 270 ng/mL, de forma a construir uma reta de calibração após a leitura de absorvâncias no espectrofotômetro de microplacas, presente no Anexo III.

Após agitação, o líquido presente nos poços foi vertido e para retirar o excesso de líquido, o suporte dos micropoços foi sacudido contra papel absorvente. Aparentemente seco, cada poço utilizado fora preenchido com 250 μ L de solução-tampão de lavagem, igualmente vertido e sacudido. Este processo foi repetido mais duas vezes.

Depois do processo de lavagem terminado adicionou-se 100 μ L de solução cromogéneo (pronto a utilizar) pertencente ao *kit* em cada poço. Este composto, quando estando na presença de soluções com glúten muda a coloração dos poços para azul, sendo mais visível nas soluções-padrão que as diferentes tonalidades de azul para as diferentes concentrações. Adicionado o cromogéneo, a placa foi incubada à temperatura ambiente, no escuro e submetido a uma agitação manual.

Ao fim dos dez minutos decorridos, foram adicionados 100 μ L de solução-tampão de paragem (também de utilização imediata) inserido no *kit* em cada poço. Durante a adição deste composto, os poços mudaram de uma coloração de azul para amarelo, sendo também visível as diferentes tonalidades. Desta forma, na Figura 11 está representado uma microplaca que torna mais perceptível as tonalidades criadas após a adição de cromogéneo e a de solução tampão de paragem, respetivamente.

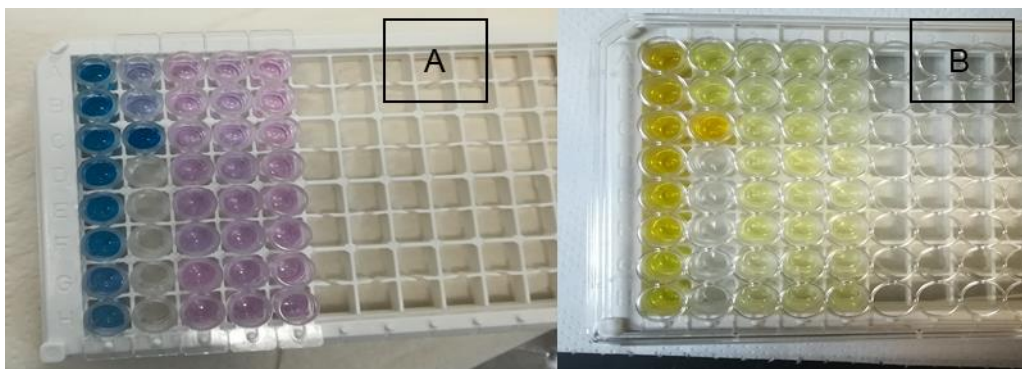


Figura 11: Esquema representativo da microplaca com as soluções-padrão em duplicado (por ordem crescente de concentração na primeira e segunda coluna) e as amostras em estudo em duplicado com a adição de cromogéneo (A). As mesmas soluções com posterior adição de solução-tampão de paragem (B).

Adicionado a solução-tampão de paragem, o suporte dos poços foi introduzido num leitor espectrofotômetro de microplacas *SynergyTM HT Multi-detection microplate reader – Biotec*, para se proceder à leitura das absorvâncias a 450 nm. A absorção lida é inversamente proporcional à concentração de gliadina.

3.5. Análise sensorial

As cervejas resultantes dos ensaios fermentativos foram submetidas a uma avaliação sensorial por parte de consumidores de cerveja. Com o intuito de averiguar a perceção destes perante as diferenças impostas de cada ensaio foi efetuado um teste de ordenação de preferência e aceitação do produto para os consumidores.

No Anexo IV encontra-se uma adaptação da ficha de prova anteriormente referida, uma vez que devido à crise pandémica, as provas foram efetuadas através da plataforma *GoogleForms*. Neste questionário além de serem avaliados os seguintes atributos através de um sistema de pontos como a aparência (cor, claridade, formação e retenção de espuma), aroma, sabor, carbonatação e apreciação global, observou-se a ordenação de preferência dos produtos pelos consumidores, bem como a intenção de compra.

Os inquiridos foram previamente selecionados com base na idade, género, de modo a abranger uma representatividade da população em geral. Esta seleção também teve cuidado em eliminar consumidores que apresentassem alguma alergia e/ou intolerância, de forma a não comprometer a saúde face aos produtos testados.

De modo a não influenciar o provador, foram servidos cerca de 50 mL de cerveja à temperatura de 10 °C, cuja ordem de degustação (da cerveja resultante do ensaio de controlo e das co-fermentações) foi aleatória, de maneira a evitar qualquer tipo de influência na análise sensorial de cada provador.

Para se proceder a esta análise sensorial, a cada inquirido foi-lhe facultado os seguintes materiais: as amostras em estudo engarrafadas e devidamente identificadas com um código, três copos de vidro claro e transparentes identificados com o código respetivo das amostras, bolachas *crackers* e um copo com água, de forma a lavar o palato e tirar o sabor entre as avaliações da amostra.

3.6. Análise estatística

Complementando os resultados obtidos, nomeadamente °Brix, pH, HPLC, determinação do amido e glúten, efetuou-se uma análise estatística aos diferentes ensaios com o objetivo de averiguar a possível ocorrência de diferenças significativas entre as médias dos resultados obtidos. Para esta análise utilizou-se o programa de análise estatística *Prism 5 (GraphPad)* para a análise de variância (ANOVA), através do teste de *Tukey* de forma a comparar mais que duas amostras, enquanto que para a comparação entre duas amostras recorreu-se ao teste T, onde ambos os testes foram estudados com um grau de confiança 95% ($\alpha=0,05$).

4. Resultados e Discussão

4.1. Seleção do estilo de cerveja utilizado

A cerveja do estilo *Weissbier*, como referido anteriormente, é uma cerveja do tipo *ale* (alta fermentação) cujo malte é composto em cerca de, pelo menos, 50% de malte de trigo. O critério de seleção do estilo de cerveja para o presente estudo teve em consideração o facto de o trigo conter uma elevada fração proteica e mais glúten, comparativamente a outros cereais como a cevada. Tendo o mosto resultante teores elevados de glúten, espera-se que tal permita observar de forma mais evidente o impacto da redução do teor de glúten, por co-fermentação de bactérias lácticas, numa cerveja que à partida apresenta teores elevados de glúten.

Considerando a receita presente na Tabela 7, obteve-se um mosto com a composição química seguinte, cujos valores apresentados são as médias dos duplicados de cada ensaio, juntamente com os respetivos desvios-padrão (Tabela 9).

Tabela 9: Composição físico-química do mosto *Weissbier*.

	Mosto <i>Weissbier</i>
Glucose (g/L)	10,92 ± 1,56
Maltose (g/L)	38,93 ± 5,78
Maltotriose (g/L)	15,80 ± 2,40
Glicerol (g/L)	0,09 ± 0,04
°Brix	12,53 ± 1,55
pH	5,33 ± 0,21
Teor de Amido (g/L)	28,343 ± 0,13
Teor de Glúten (ppm)	113,1

4.2. Caracterização e seleção das estirpes e das condições de fermentação

A seleção de bactérias ácido lácticas como forma de redução do teor de glúten de cervejas resultou da pesquisa bibliográfica realizada no início do trabalho. A acidificação do mosto promovida pela presença das BAL incita a atividade proteolítica, acelerando as reações enzimáticas, e consequentemente assegurando a degradação da fração proteica. Esta degradação resulta da redução do teor de glúten na cerveja, tornando-a assim num produto mais saudável. Ainda em termos tecnológicos, as BAL aumentam a atividade de β -glucanases, que ao degradar os β -glucanos, reduzem a viscosidade da cerveja auxiliando a etapa de filtração, resultando assim numa cerveja mais límpida e brilhante, bem como numa espuma mais estável (Rouse & Van Sinderen, 2008).

Tendo como ponto de partida a utilização de BAL, procedeu-se à seleção das estirpes de BAL mais adequadas de entre as estirpes disponíveis no Laboratório de Bioenergética Microbiana e na coleção de culturas de bactérias do laboratório de Microbiologia do ISA. O método de seleção das bactérias ácido lácticas baseou-se em estudos prévios que revelaram resultados quer em termos de

redução do teor de glúten em bebidas fermentadas (objetivo principal do trabalho), como também com atributos sensoriais e benéficos para a saúde do consumidor.

Entre as diversas espécies de bactérias ácido lácticas que apresentam uma boa capacidade fermentativa e com produtos metabólicos que suscitem interesse, não comprometendo a identidade da cerveja, selecionaram-se duas espécies de bactérias do género *Lactobacillus*: *L. plantarum* e *L. brevis*. Ambas as espécies, quando utilizadas em co-fermentação com a levedura *S. cerevisiae*, toleram as condições ambientais a que estão sujeitas ao longo da fermentação do mosto de cerveja: stress osmótico devido à elevada concentração de açúcares do mosto, pH próximo de 5, presença de etanol e de CO₂. Em estudos anteriores foi demonstrado que *L. brevis* tem maior capacidade adaptativa ao meio comparativamente a *L. plantarum* (Dysvik et al., 2020).

Relativamente a aspetos sensoriais, em estudo realizado por Dysvik e colaboradores (2020), a cerveja produzida por co-fermentação com *L. plantarum* resultou numa cerveja com um odor frutado e a frutos secos, enquanto *L. brevis* proporcionou um sabor ácido e adstringente (Dysvik et al., 2020). Além destes perfis organoléuticos apresentados, tanto *L. plantarum* como *L. brevis* apresentam uma atividade proteolítica elevada (Afriani et al., 2018). Esta característica conduz a uma série de vantagens, quer a nível tecnológico, enquadradas no objetivo principal do presente trabalho, como em termos de saúde.

Em relação à estirpe de levedura, optou-se por utilizar uma estirpe de *Saccharomyce cerevisiae* comercial, habitualmente utilizada pelos cervejeiros artesanais para produção de *Weissbier*, a estirpe *Blanche (Brewferm)*, de forma a ter como controlo uma fermentação com as características padrão de uma típica cerveja *Weissbier*

Em relação às condições de fermentação, foram selecionados dois métodos: inoculação sequencial de BAL e *Saccharomyces cerevisiae*, e co-inoculação simultânea de BAL e *Saccharomyces cerevisiae*.

4.3. Evolução dos parâmetros microbiológicos e físico-químicos ao longo dos ensaios fermentativos

4.3.1. Evolução da microbiota

Os diversos ensaios fermentativos foram sujeitos à avaliação da evolução da população microbiana das diferentes estirpes utilizadas. Para as duas estirpes de bactérias lácticas apenas se observou em conjunto o número das células viáveis cultiváveis, uma vez que nos dois ensaios as estirpes foram adicionadas em conjunto, sendo também indistinguíveis em placa com meio de MRS. Relativamente à única estirpe de levedura utilizada, além da avaliação o número de células viáveis cultiváveis, também se complementou esta análise através da contagem de células viáveis e totais.

Na Figura12A, está representada a evolução da concentração de células viáveis cultiváveis de levedura. Estes valores resultam da média de valores observados nos duplicados. Na Figura12B

observa-se a evolução da percentagem da percentagem de células viáveis face às células totais, que se obtém da seguinte maneira: $viabilidade\ relativa = \frac{células\ viáveis}{células\ totais} \times 100$.

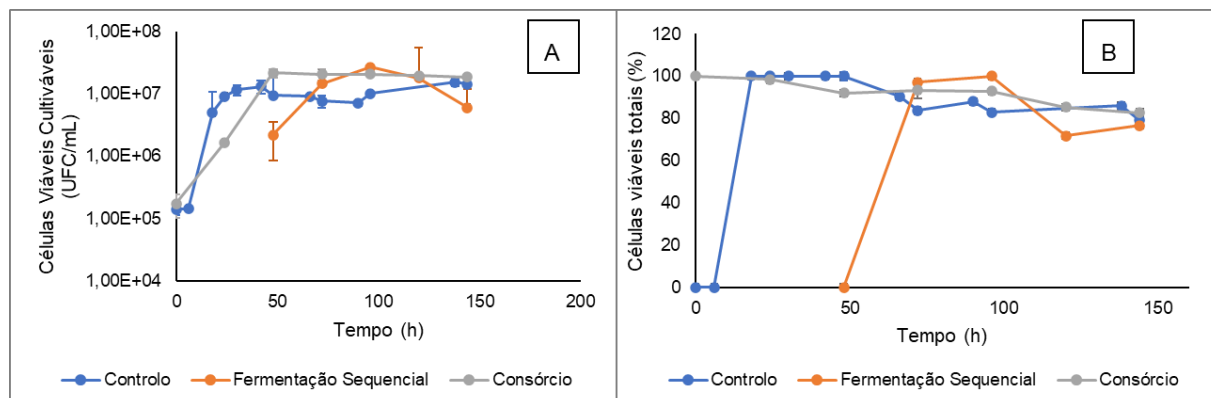


Figura 12: Evolução da viabilidade da estirpe *S. cerevisiae* Blanche (comercial). (A) Evolução das células viáveis cultiváveis ao longo da fermentação dos três cenários existentes. (B) Variação da viabilidade relativa dos diferentes ensaios fermentação dos três cenários existentes.

Quanto aos resultados obtidos da Figura 12, observam-se padrões de crescimento bem perceptíveis. Além disso, os três ensaios atingem o crescimento máximo 48 horas após a inoculação da levedura no mosto *Weissbier*.

No crescimento de células viáveis totais relativamente às leveduras observa-se que a população inicial em todos os ensaios é de cerca de 10^5 , ocorrendo um aumento da população até cerca de 10^7 . Comparando os declives da fase inicial, observa-se um crescimento mais célere no ensaio Controlo, que se pode dever à ausência das BAL durante este processo de fermentação, sendo mais fácil a adaptação da levedura ao meio do mosto, promovendo o crescimento e conseqüente produção de metabolitos.

No ensaio com BAL e *S. cerevisiae* em simultâneo (Consórcio), verifica-se que a inoculação de bactérias ácido lácticas em conjunto com as leveduras atrasa o crescimento destas últimas face ao observado no ensaio sem BAL (Controlo), o que pode estar relacionado com a adaptação ou até competição entre estes dois microrganismos. Este atraso foi igualmente observado no ensaio respeitante à Fermentação Sequencial, em que a levedura foi adicionada 48 horas após a inoculação das BAL, reforçando a conclusão anterior. Outra observação que poderá justificar este atraso é a produção de ácidos, como o ácido acético, por parte das bactérias que pode interferir e conseqüentemente dificultar a multiplicação das leveduras.

Além do estudo da evolução da população por parte das leveduras, analisou-se também o número de células viáveis cultiváveis relativas às duas estirpes de bactérias lácticas utilizadas em conjunto nos dois ensaios: Fermentação Sequencial e Consórcio. Estes valores presentes na Figura 13 correspondem às médias dos duplicados de cada ensaio.

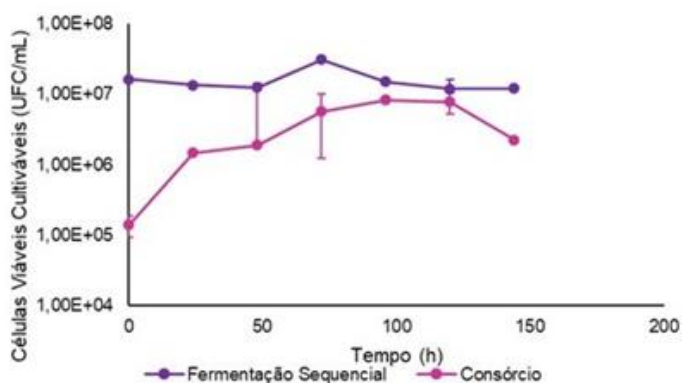


Figura 13: Evolução das células viáveis cultiváveis das bactérias ácido lácticas (*L. brevis* e *L. plantarum*).

Como é observável no ensaio da Fermentação Sequencial, pode-se concluir que a população de bactérias lácticas não aumentou acima de 10^7 UFC/mL, contudo estas permanecem viáveis durante toda a fermentação. As estirpes selecionadas possuem a capacidade de resistir a um meio desfavorável como o mosto e a cerveja, isto é, com elevada concentração inicial de açúcares e pH próximo de 5 no mosto, e a presença de etanol e baixo teor de oxigênio e, conseqüentemente, alto teor de CO_2 , não perdendo viabilidade, muito embora o meio não tenha demonstrado promover o aumento do número de células de BAL. Complementando esta confirmação, verifica-se ainda que nesta fermentação o crescimento do número de células viáveis das bactérias lácticas só foi impulsionado a partir das 48 horas, tempo correspondente à introdução das leveduras no meio. Tal comportamento permite colocar a hipótese de as leveduras disponibilizarem condições de crescimento para que as bactérias lácticas se possam reproduzir neste meio, isto é, existir uma interação entre estes os dois tipos de microrganismos. Já no ensaio correspondente ao Consórcio, que se iniciou com uma menor concentração de BAL, denota-se um crescimento desde o início da fermentação, uma vez mais confirmando que a presença das leveduras auxilia o crescimento das bactérias lácticas.

Ainda relativamente ao crescimento destes microrganismos no mosto de cerveja, observa-se que estes poderão ter conduzido a um aumento da concentração de ácidos fracos, podendo influenciar o produto final em termos sensoriais.

4.3.2. Evolução dos parâmetro físico-químicos ao longo da fermentação

Dada a complexidade da etapa de fermentação e de modo a garantir as condições inerentes para que ocorram os processos metabólicos, foram analisados alguns parâmetros físico-químicos, tais como: variação do valor de pH, variação do teor de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$), o consumo dos açúcares e ainda a produção de glicerol e etanol.

4.3.2.1. Evolução do pH e do consumo dos sólidos solúveis totais

Na Figura 14 está representada a evolução do pH e do teor de sólidos solúveis no decorrer da fermentação.

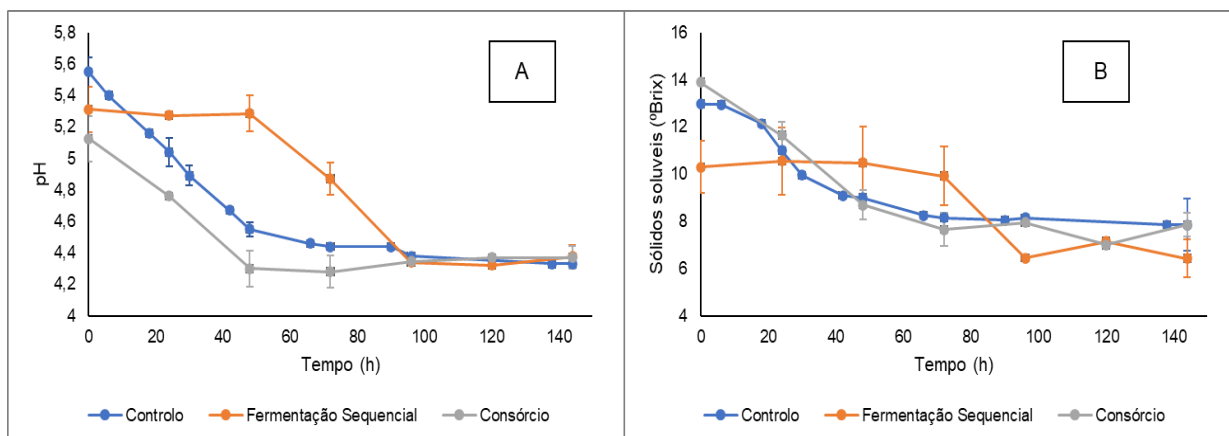


Figura 14: Evolução pH (à esquerda) e do grau Brix (à direita) nos três ensaios executados durante a etapa de fermentação.

Referente aos valores de pH observados, verifica-se que todos os ensaios respeitam o comportamento expectável, isto é, pela produção de metabolitos por parte da microbiota ocorre uma diminuição dos valores deste parâmetro durante a fermentação. Nos três ensaios executados, cujas condições de inoculação foram descritas na Tabela 8, também se observa que os valores de pH final não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$), onde o Ensaio Controlo termina com um pH equivalente a 4,33, enquanto os ensaios com co-fermentação com bactérias lácticas (Fermentação Sequencial e Consórcio) terminam ambos com um pH de 4,37.

O ensaio alusivo à Fermentação Sequencial possibilita observar que, durante a presença apenas de BAL (as primeiras 48 horas), não há um decréscimo de pH muito considerável, o que indica que estes microrganismos, apesar de viáveis (visível na Figura 13), não contribuem para a acidificação da cerveja. Ao invés, após a inoculação da levedura é que se inicia a diminuição deste parâmetro, o que está de acordo com os resultados obtidos numa fermentação alcoólica de mosto com trigo por leveduras (Tafera e Admassie, 2020). Ainda comparando este ensaio com o Consórcio, o produto final obtém o mesmo valor de pH que é ligeiramente inferior ao Controlo, o que pode evidenciar que o momento de adição das leveduras 48 horas após a inoculação das BAL não influencia este parâmetro (Ripari et al., 2018).

Observando os três ensaios e comparando os gráficos de viabilidade celular das Figura 12 e 13, verifica-se que as leveduras são as principais responsáveis pelo decréscimo do pH, uma vez que os declives dos três cenários não são significativamente diferentes entre si ($p > 0,05$) após a inoculação das leveduras no meio.

Quanto à determinação dos sólidos totais solúveis presentes no mosto, na Figura 14B, também se observa um comportamento expectável durante a fermentação (Grassi et al., 2014), isto é, o consumo de açúcares por parte dos microrganismos inoculados e por isso, um decréscimo do °Brix durante a fermentação. Em ambos os ensaios que se iniciam com a inoculação de leveduras (Controlo e Consórcio) é observado um decréscimo contínuo até às 72 horas após o início da fermentação, indicando a ocorrência do consumo e esgotamento dos diferentes açúcares presentes no mosto a fermentar.

Analisando o comportamento do ensaio da Fermentação Sequencial neste parâmetro, este permite afirmar que as bactérias lácticas, quando isoladas, não contribuíram para a diminuição do °Brix, comparativamente aos restantes ensaios ($p < 0,05$), porém na presença das leveduras poderão ter ajudado a esgotar os açúcares. Assim, mais uma vez pode-se observar que as leveduras tiveram um papel preponderante para o consumo dos sólidos totais solúveis. No final da fermentação as médias dos valores obtidos foram: 7,85 °Brix para o ensaio Controlo, para a Fermentação Sequencial 6,43 °Brix e no Consórcio 7,85 °Brix. Estes valores estão de acordo com os valores apresentados abaixo para a variação do consumo de açúcares determinada por HPLC.

4.3.2.2. Evolução do consumo de substratos e produção de glicerol e etanol ao longo da fermentação

Complementando os parâmetros estudados anteriormente fez-se uma análise mais pormenorizada do consumo de açúcares e ainda da produção de glicerol e etanol durante a etapa de fermentação por HPLC. Dado os valores dos açúcares no mosto inicial presente na Tabela 9, a Figura 15 demonstra o comportamento destes compostos nos três diferentes cenários estudados.

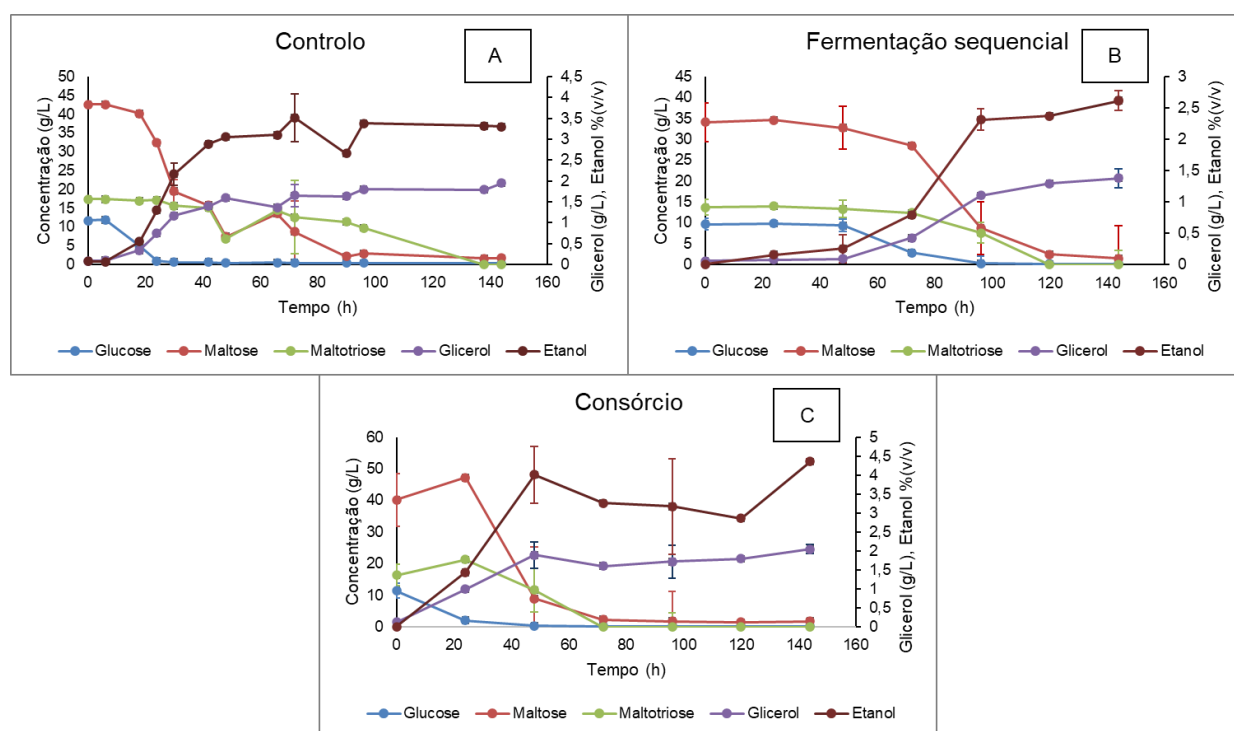


Figura 15: Evolução do consumo de açúcares e produção de glicerol e etanol no ensaio Controlo (A), Fermentação Sequencial (B) e do Consórcio (C).

Relativamente ao perfil de consumo de açúcares é possível observar-se em todos os ensaios que ocorreu um consumo sequencial. A glucose foi o primeiro composto a esgotar-se, sendo que o consumo da maltotriose é iniciado justamente após o consumo maioritário da maltose, tal como evidenciado no ponto 2.2.3.3. Repara-se também que a maltose não foi totalmente esgotada nos três cenários de estudo, porém este dissacárido encontra-se em maiores proporções no início da fermentação, sendo maioritariamente consumido, mas dificilmente metabolizado quando presente em concentrações residuais.

No gráfico da Figura 15, referente à Fermentação Sequencial, observa-se que não ocorre praticamente o consumo destes açúcares por parte das bactérias lácticas (entre as zero horas e as 48 horas), uma vez que as concentrações dos mesmos permanecem quase inalteradas, estando em concordância com a análise do °Brix ($p > 0,05$). Contudo, após a inoculação da levedura no mosto, o consumo da glucose foi ligeiramente retardado, tendo demorado mais tempo comparativamente aos outros ensaios. Estas observações possibilitam assim admitir que o desempenho do consumo de açúcares provém significativamente da presença de leveduras. Já a velocidade de consumo dos restantes açúcares permanece igual nos três ensaios efetuados, o que do ponto de vista tecnológico transparece que é mais viável inocular a microbiota no mesmo momento, como assim representa o ensaio de Consórcio.

Relativamente à questão da produção de glicerol, os três ensaios comprovam que a produção deste metabolito poderá ser atribuída às leveduras, uma vez que não aparenta qualquer evolução significativa nas primeiras 48 horas da Fermentação Sequencial. Porém, uma produção maior de glicerol permite uma maior sobrevivência das BAL, pois estes microrganismos utilizam este metabolito quando são sujeitos a um stress osmótico (Bartle et al., 2019). Além disso, o produto final dos restantes ensaios, devido ao aumento de pelo menos o dobro da concentração inicial de glicerol, poderá a nível sensorial resultar numa cerveja com maior viscosidade, maior corpo.

Quanto ao principal produto de fermentação alcoólica dos açúcares, o etanol, de um modo muito sucinto é possível visualizar que há uma maior produção deste composto no ensaio do Consórcio. Este comportamento é justificado pela rápida assimilação dos monossacáridos por parte das leveduras, permitindo assim a produção de etanol. Mais uma vez está demonstrado que na Fermentação Sequencial, as BAL ao atuarem isoladamente nas primeiras 48 horas não têm um papel preponderante na produção de etanol.

Uma observação efetuada na Fermentação Sequencial relativamente às BAL é que estas, mesmo que consigam resistir a um meio como o mosto de cerveja, não têm a capacidade de se multiplicarem, necessitando possivelmente que as leveduras atuem e hidrolisem parcialmente os di e trissacáridos para que as BAL os possam metabolizar. Ao comparar o esgotamento dos açúcares entre o ensaio da Fermentação Sequencial e o Consórcio, neste último cenário este é mais célere, o que pode comprovar que as leveduras possam produzir fatores de crescimento necessários para que as bactérias lácticas auxiliem no consumo destes compostos e conseqüente crescimento, à semelhança do que é por exemplo observado no caso do kefir de água (Leroi e Pidoux, 1993). Para além disso, *L. plantarum* sendo heterofermentativa facultativa, tal como as leveduras, consome preferencialmente glucose, enquanto que *L. brevis* sendo heterofermentativa obrigatória poderá consumir primeiramente a maltose (Peyer, 2017). Este último aspeto, poderá justificar a maior velocidade de redução deste dissacárido na Fermentação Sequencial e no Consórcio, relativamente ao ensaio Controlo.

Além dos compostos consumidos e produzidos representados na Figura 15, também foi consumida frutose e produzidos ácidos orgânicos, como ácido láctico e acético. Estes compostos não estão representados uma vez que se encontravam numa concentração muito próxima de zero. Os ácidos orgânicos produzidos dão a entender que ocorreu uma fermentação hétero-láctica por parte das

bactérias lácticas. De forma a estudar-se a produção destes ácidos dever-se-ia ter feito uma análise de absorvância na gama do ultravioleta, uma vez que o método utilizado (medição do índice de refração dos açúcares por HPLC) não é tão sensível para a deteção e quantificação destes compostos (Yu et al., 2020).

Conciliando ainda a análise do consumo de açúcares com a evolução da viabilidade da microbiota, observa-se que após o consumo dos monossacáridos não ocorre multiplicação da viabilidade de leveduras nem de bactérias lácticas.

4.3.2.3. Análise do amido

De modo a quantificar o teor de amido antes e após a fermentação utilizou-se o método espectrofotométrico do ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Esta análise, além da quantificação de amido no mosto e no final da fermentação, permitiu quantificar o teor de açúcares redutores, sendo que na cerveja estão presentes a glucose, maltose, maltotriose e frutose (MacLeod, 1953).

Tal como indicado nos métodos, as amostras analisadas (início e fim de fermentação) foram submetidas ao mesmo método de análise, variando volumes e diluições para a análise ao sobrenadante e para o *pellet*, com a presença ou ausência da enzima α -amilase. Determinadas as absorvâncias, com recurso à reta de calibração presente no Anexo II e multiplicadas pelo fator 0,9 (Yong et al., 2019), foram calculadas as concentrações dos açúcares redutores (na ausência de α -amilase) e de amido (calculado a partir da diferença entre os valores das amostras hidrolisadas pela α -amilase e das mesmas amostras sem a enzima).

Na Figura 16 observam-se as médias e os desvios-padrão correspondentes às concentrações de amido e açúcares redutores, respetivamente.

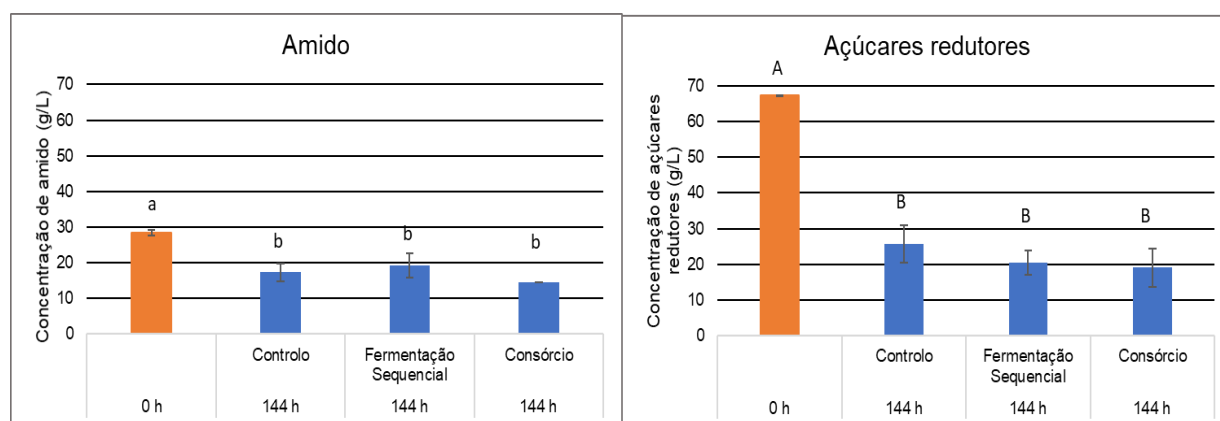


Figura 16: Quantificação do teor de amido (A) e dos açúcares redutores (B) no início e final da fermentação.

Em ambos os gráficos presentes na Figura 16 o tempo zero corresponde à média, assim como os desvios-padrão, dos tempos iniciais dos três ensaios em duplicado.

Como é observável e expectável, existe uma redução do amido e dos açúcares redutores durante o processo de fermentação em todos os ensaios efetuados, sendo notavelmente maior no ensaio do Consórcio, onde ocorre uma redução do valor inicial (28,343 g/L) para um valor final de 14,582 g/L de amido.

Complementando este estudo com a análise estatística, conclui-se que quer para o teor de amido, quer de açúcares redutores, o início da fermentação é significativamente diferente de todos os resultados obtidos nos três ensaios ($p < 0,05$), porém comparando apenas entre os finais das fermentações estes não apresentam uma diferença significativa ($p > 0,05$).

Ainda relativo à quantificação dos açúcares pelo método DNS contém um erro associado, comparativamente aos resultados determinados por HPLC, sendo este último considerado mais fiável na deteção e quantificação destes componentes. Porém, e de forma a quantificar o teor de amido, este deve ser comparado aos açúcares determinados pelo mesmo método. Assim, uma forma de obter um valor mais próximo da realidade nos três ensaios é a partir da extrapolação da relação deste método colorimétrico aos resultados obtidos dos açúcares por HPLC.

4.3.2.4. Análise do teor de glúten

Relativamente ao conteúdo em glúten de cada uma das fermentações realizadas os resultados obtidos encontram-se apresentados na Figura 17.

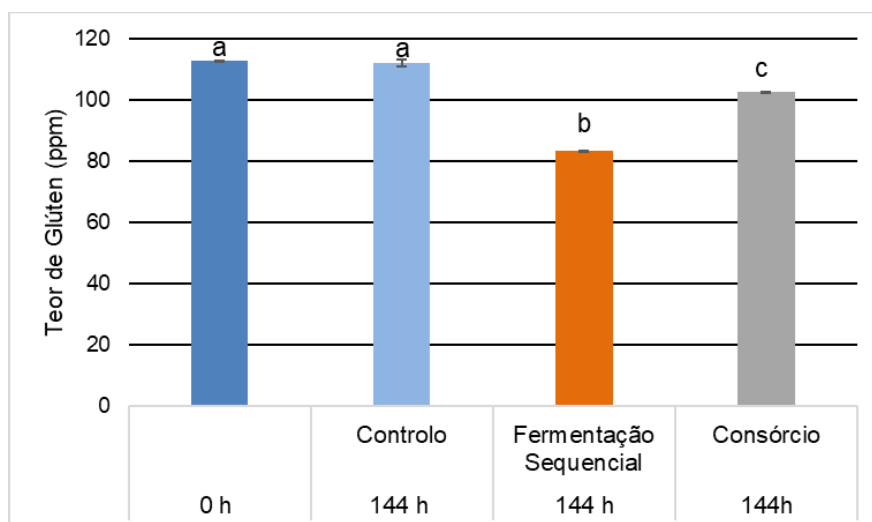


Figura 17: Teor em glúten nas cervejas produzidas pelo método padrão e por co-fermentação com BAL (adição sequencial e consórcio).

Tal como é possível observar na Figura 17, o mosto não fermentado apresenta um valor de glúten de 113,1 ppm. Após a fermentação dos três ensaios, todos apresentaram uma redução, sendo que no Controlo em termos estatísticos esta não é considerado como sendo uma redução significativa ($p > 0,05$).

Em ambas as fermentações com BAL as cervejas obtiveram uma redução de concentração de glúten significativa comparativamente ao mosto por fermentar e entre os diferentes ensaios ($p < 0,05$), cujos valores médios finais para a Fermentação Sequencial obtida foi 83,4 ppm e no Consórcio 102,8 ppm. Esta redução foi mais significativa no caso da Fermentação Sequencial, na qual as BAL foram adicionadas no início da fermentação, só sendo adicionada a estirpe de *S. cerevisiae* ao fim de 48 horas de fermentação, tendo sido a única em que o processo permitiu obter uma maior redução do teor em glúten, revelando ser o mais promissor ($p < 0,05$).

Comparando os ensaios Fermentação Sequencial e Consórcio, é possível afirmar que a ativação das proteases pelas BAL é iniciada logo após a inoculação destas no mosto, reduzindo o teor de glúten. Apesar de existir uma interação entre as estirpes inoculadas e de as leveduras disponibilizarem substrato, hidrolisando parcialmente os açúcares presentes de forma a manter as BAL viáveis, estes microrganismos reduzem significativamente o teor de glúten quando isolados.

Neste caso, os valores obtidos no ensaio relativo à Fermentação Sequencial (83,4 ppm), segundo consta no regulamento (CE) n.º 41/2009, permite alegar esta cerveja como sendo de “teor reduzido de glúten”, uma vez que contém valores inferiores a 100 ppm, porém não pode ser classificada como cerveja “sem glúten” dado que estes teores ainda são superiores aos 20 ppm considerados no regulamento (Vassiliou, 2009).

4.4. Avaliação dos parâmetros em análise na pós fermentação

Terminada a fermentação, a Tabela 10 sumariza o perfil dos parâmetros avaliados resultantes de cada ensaio, comparativamente ao mosto. Estes valores representados são relativos às médias das fermentações efetuadas em duplicado de cada ensaio \pm desvio-padrão. Relativamente aos açúcares residuais expressos na tabela, estes representam a soma das médias das concentrações finais de glucose, maltose e maltotriose, respetivamente.

Tabela 10: Características dos três ensaios no final da fermentação.

	Mosto	Final da Fermentação		
		Controlo	Fermentação Sequencial	Consórcio
Açúcares (g/L)	65,65 \pm 13,05 ^a	0,67 \pm 0,90 ^b	0,54 \pm 0,71 ^c	0,67 \pm 0,87 ^b
Glicerol (g/L)	0,09 \pm 0,04 ^A	1,95 ^B	1,38 \pm 0,05 ^{BC}	2,04 \pm 0,22 ^C
Etanol %(v/v)	0,02 \pm 0,03 ^d	3,31 ^e	2,62 \pm 0,25 ^{ef}	4,35 \pm 0,37 ^g
°Brix	12,53 \pm 1,55 ^D	7,85 \pm 1,01 ^E	6,43 \pm 0,81 ^F	7,85 \pm 0,49 ^E
pH	5,33 \pm 0,21 ^h	4,33 ⁱ	4,38 \pm 0,01 ^j	4,37 \pm 0,07 ^j
Teor de Amido (g/L)	28,343 \pm 0,13 ^K	17,35 \pm 2,50 ^L	19,28 \pm 3,45 ^L	14,58 ^L
Teor de Glúten (ppm)	113,10 ^W	111,50 ^W	83,40 ^Y	102,80 ^Z

Embora o consumo de açúcares tenha sido mais demorado no ensaio da Fermentação Sequencial, este apresenta um maior consumo total, além disso, esta observação também é comprovada pelo °Brix, uma vez que este ensaio apresenta menor valor neste parâmetro. Também neste ensaio é perceptível compreender que a inserção das leveduras tardia, comparativamente aos outros cenários, afetou a produção de etanol.

Outro aspeto visível nesta tabela é que a acidez resultante do metabolismo das bactérias ácido lácticas não interfere com o momento em que estas são inoculadas, uma vez que o pH é consideravelmente igual entre o ensaio da Fermentação Sequencial e a do Consórcio.

Estes valores representados na Tabela 10 não são, contudo, relativos ao produto final, uma vez que ainda se adicionou sacarose (6 g/L) de forma a fomentar uma refermentação em garrafa e permitir a carbonatação da cerveja.

4.5 Análise sensorial

Após refermentação em garrafa, os produtos finais de cada ensaio foram sujeitos a uma análise sensorial, sendo que os inquiridos nesta prova foram consumidores não treinados e não celíacos. Desta forma, o teste implementado não contém descritores concretos, contudo efetuou-se um teste aceitação do produto, utilizando alguns parâmetros, tais como aparência, aroma e sabor, bem como a respetiva ordenação de preferência, prova presente no Anexo IV. Nesta prova, os códigos utilizados foram: TE8 para a cerveja resultante do ensaio Controlo, D3F corresponde ao ensaio Fermentação Sequencial, enquanto o 1XC é respeitante ao Consórcio.

Face aos 34 provadores inquiridos foi possível apurar os seguintes resultados apresentados na Figura 18.

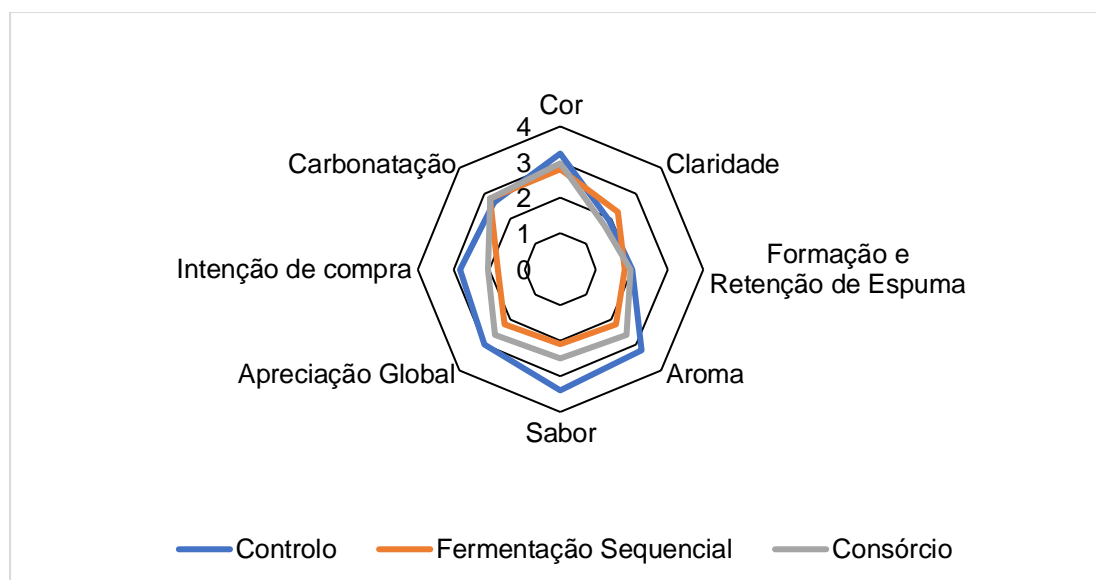


Figura 18: Resultados da análise sensorial dos produtos finais relativos aos três ensaios efetuados.

Embora o teste presente no Anexo IV tenha sido classificado por um sistema não-numérico, foi convertido para uma escala numérica, de forma a possibilitar e facilitar a análise dos dados, tornando-se mais perceptível.

Analisando de um modo geral o gráfico aranha presente na Figura 18, os três produtos finais possuem uma maior cotação média na cor, que foi grandemente avaliada como um aspeto agradável. Com menor cotação encontram-se os parâmetros de claridade e a formação e retenção de espuma. A claridade para os três produtos foi classificada maioritariamente entre um produto turvo ou com ligeira turbidez. Este aspeto pode dever-se à falta da etapa de filtração no processo artesanal de cerveja comparativamente à produção industrial, bem como à não precipitação da maioria das proteínas após engarrafamento. Porém, esta classificação atribuída “de serem turvas”, não deverá ser considerado um aspeto negativo, uma vez que as cervejas do estilo *Weiss*, ao utilizarem trigo (cereal com maior teor

proteico), resultam em cerveja mais turvas quando comparadas a cervejas de outros estilos que utilizam exclusivamente malte de cevada (Eßlinger, 2009).

A cerveja resultante da Fermentação Sequencial apresenta uma melhor pontuação relativamente à claridade (2,27 em 4), esta pode dever-se ao facto das BAL terem uma ação proteolítica capaz de diminuir o teor de glúten quando atuam isoladamente no mosto, reduzindo o teor de proteína e originando cervejas menos turvas.

Quanto à formação e retenção de espuma, sendo uma cerveja do estilo *Weissbier*, conhecida por possuir uma espuma estável e consistente, os resultados obtidos das provas não refletem as características desejadas. A espuma é importante para reter o aroma e *flavour*, desacelerar a libertação de CO₂ e manter a temperatura (Eßlinger, 2009). Durante a prova, as três cervejas não verificaram uma formação e retenção de espuma agradável, sendo esta quase nula. Este aspeto poderá estar relacionado com a forma de como foram servidas nos copos, dado que na maioria das provas tentou-se evitar verter os depósitos presentes da garrafa resultantes das leveduras. Noutras situações ocorreu formação de espuma, porém prejudicou a avaliação da claridade, resultando numa cerveja turva. Algo que pode confirmar esta hipótese são os comentários relativos ao sabor e aroma que foram perceptíveis e que permaneceram durante a prova, o que evidencia que a problemática relativa à espuma pode dever-se à forma como foram servidas as amostras.

Sabendo que as três cervejas produzidas resultam do mesmo mosto do estilo *Weissbier*, diferenciando-se apenas nas estirpes inoculadas presentes na Tabela 8, denota-se que a cerveja resultante do ensaio Controlo é a que possui uma melhor classificação na maioria dos parâmetros avaliados, com uma pontuação média de 2,78 em 4, seguindo-se da cerveja Consórcio com 2,40 e, por último a Fermentação Sequencial com 2,24. Esta conclusão também é reforçada no parâmetro respeitante à intenção de compra do produto, onde se pode averiguar a mesma ordem.

Ainda na prova sensorial foi questionado se haveria semelhanças entre as três cervejas, as respostas foram muito díspares, sendo que 31,25% reconheceu que as cervejas não eram idênticas entre si e 25% considerou que o produto correspondente ao Controlo era semelhante ao do Consórcio. Outra observação interessante obtida neste questionário foi que a pouca expressão visual de espuma poderia induzir o consumidor a pensar que a cerveja poderia estar “morta”, mas que durante a degustação a maioria considerou assinalar a resposta “Ligeiramente carbonatada”.

5. Conclusões finais e perspectivas futuras

A indústria cervejeira tem demonstrado um crescimento relativamente à melhoria tecnológica dos processos, à inovação de matérias primas de forma a ganhar notoriedade no mercado e a suprir todas as necessidades do consumidor, fazendo com que a identidade do consumidor se relacione com o produto.

Dado que uma das principais preocupações dos consumidores é a sua saúde e que a prevalência de alergias e intolerâncias alimentares, mesmo sendo ainda sub-diagnosticadas, tem vindo a aumentar, os consumidores são motivados a procurar produtos alimentares que contribuam para a manutenção ou melhoria do seu bem-estar. Em 2018, estimou-se que pelo menos 1% da população portuguesa fosse doente celíaca, sendo ainda maior o número de pessoas que apresenta algum grau de intolerância ao glúten. Desta forma, o presente trabalho teve o intuito de estudar a possibilidade de redução do teor de glúten numa cerveja de trigo por processos fermentativos, utilizando bactérias lácticas em co-fermentação com uma estirpe comercial de *Saccharomyces cerevisiae*. Esta estratégia surgiu como forma a possibilitar a produção de uma cerveja tendo por base o mesmo tipo de cereais habitualmente usados em cervejas com glúten e manter assim as características sensoriais do produto final tão próximas quanto possível das cervejas tradicionais.

Comparando os ensaios efetuados, é possível concluir que as bactérias lácticas não tiveram um impacto considerável em diversos parâmetros físico-químicos do produto final: tais como pH, °Brix e ainda o consumo de açúcares analisados por HPLC. Desta forma e observando os resultados da análise sensorial, é possível afirmar que as bactérias lácticas não alteraram negativamente a identidade da cerveja, uma vez que não acidificaram acentuadamente o meio, nem houve produção significativa dos metabolitos resultantes da fermentação heteroláctica (ácido acético e ácido láctico). Ainda que viáveis, estes microrganismos não resistiram ao meio do mosto, sendo que as leveduras *S. cerevisiae Blanche* impulsionaram, como expectável, o processo de fermentação. Por sua vez as BAL devido aos seus sistemas proteolíticos, possibilitaram a redução do teor de glúten, sendo visível que na Fermentação Sequencial ocorreu uma redução superior relativamente ao Consórcio.

O objetivo deste estudo em reduzir o teor de glúten numa cerveja do estilo *Weissbier* foi bem-sucedido em ambos os ensaios por co-fermentação com bactérias lácticas. De um mosto com 113,1 ppm de glúten, o ensaio correspondente à Fermentação Sequencial reduziu para um teor de 83,4 ppm, já o ensaio relativo ao Consórcio obteve um teor de glúten equivalente a 102,8 ppm.

Como consta no Regulamento (CE) n.º. 41/2009, um produto alimentar pode conter a alegação “teor muito baixo de glúten” se obtiver valores inferiores a 100 ppm. Desta forma, a cerveja resultante do ensaio da Fermentação Sequencial cumpre a condição alegada. Contudo, a Fermentação Sequencial, mesmo sendo o modo mais eficiente para a redução do glúten, pode suscitar outras desvantagens para a produção de cerveja, nomeadamente a nível tecnológico, pois o facto de inocular os diferentes microrganismos em momentos distintos complica o processo de fabrico, ao invés da inoculação conjunta, e além disso pode comprometer a segurança do mosto e promover possíveis contaminações.

Esta temática estudada origina uma panóplia de trabalhos futuros como o estudo do impacto de cada estirpe de bactérias lácticas utilizada neste trabalho perante o mosto de cerveja, de forma a entender, tanto a nível físico-químico como sensorial, o contributo individual das mesmas. Também seria interessante utilizar-se outras estipes de bactérias lácticas como as *L. sanfranciscensis*, tendo sido anteriormente utilizadas em estudos relativos à redução de glúten noutros produtos alimentares.

O presente trabalho selecionou o estilo *Weissbier*, uma vez que esta contém um teor de glúten elevado comparativamente a outras cervejas, porém seria útil aplicar esta temática noutros estilos, com menor teor de glúten.

Além das análises efetuadas poder-se-ia estudar o perfil dos compostos aromáticos desenvolvidos em cada ensaio e uma análise sensorial a um painel de provadores treinado.

6. Bibliografia

Afriani, Arnim, Marlida, Y., & Yuherman (2018). Isolation and characterization of lactic acid bacteria proteases from Bekasam for use as a beef tenderizer. *Pakistan Journal of Nutrition*, 17(8), 361–367. <https://doi.org/10.3923/pjn.2018.361.367>.

Associação Portuguesa de Celíacos (2020). Disponível em: <https://www.celiacos.org.pt/>. Acesso em: 20/03/2020.

Bamforth, C. W., *et al.* (2006). Contributor contact details. In C. W. B. T.-B. Bamforth (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. xi–xiv). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-84569-003-8.50024-1>.

Barth, R. (2013). The chemistry of beer. In *ACS Symposium Series* (Vol. 1130). <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1130.ch004>. American Chemical Society.

Bartle, L., Sumby, K., Sundstrom, J., & Jiranek, V. (2019). The microbial challenge of winemaking: Yeast-bacteria compatibility. *FEMS Yeast Research*, 19(4), 1–16. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz040>.

Bathula, S. R. (2018). Extraction of gluten from food material. *MOJ Proteomics & Bioinformatics*, 7(3), 199–204. <https://doi.org/10.15406/mojpb.2018.07.00234>.

Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? *Journal of gastroenterology and hepatology*, 32, 78-81. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>

Briggs, D.E. & Boulton, Ch & Brookes, P.A. & Stevens, R.. (2004). *Brewing: Science and Practice*. Brewing: Science and Practice. 1-881. 10.1201/9780203024195.

Cabras, I., & Higgins, D. M. (2016). Beer, brewing, and business history. *Business History*, 58(5), 609–624. <https://doi.org/10.1080/00076791.2015.1122713>.

Callejo, María Jesús & Gonzalez, Carmen & Morata, Antonio. (2017). Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Bottle Fermentation of Aged Beers. 10.5772/intechopen.68793.

CELIA. 2020. What about glúten?. Disponível em: <https://www.celialager.co.uk/what-about-the-gluten/>. Acesso em: 24/03/2020.

Codex Alimentarius Commission, (2015). Codex Standard 118-1979 (revised 2015), Foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. *FAO/WHO, Rome*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Colgrave, M. L., Byrne, K., & Howitt, C. A. (2017a). Food for thought: Selecting the right enzyme for the digestion of gluten. *Food Chemistry*, 234(May), 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.05.008>.

Colgrave, M. L., Byrne, K., & Howitt, C. A. (2017b). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Analysis Reveals Hydrolyzed Gluten in Beers Crafted to Remove Gluten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(44), 9715–9725. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03742>.

Damm (2020). Daura The Gluten Free Beer. Disponível em: <https://www.damm.com/en/beers/daura>. Acesso em: 24/03/2020.

De Keukeleire, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, 23. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>.

Dysvik, A., *et al.* (2020). Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. *Frontiers in Microbiology*, 11(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>.

Eaton, B. (2017). An Overview of Brewing. *Handbook of Brewing*, 53–66. <https://doi.org/10.1201/9781351228336-3>.

Eßlinger, H. M. (2009). *Handbook of Brewing Processes, Technology, Markets* (1st.). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527623488>.

Fanari, M., *et al.* (2018). Comparison of enzymatic and precipitation treatments for gluten-free craft beers production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 49, 76–81. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2018.07.017>.

Fiedler, K. L., *et al.* (2019). Detection of gluten in a pilot-scale barley-based beer produced with and without a prolyl endopeptidase enzyme. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 36(8), 1151–1162. <https://doi.org/10.1080/19440049.2019.1616830>.

Garcia, M.M.E. - Produção de cerveja: utilização de estirpes não-convencionais em co-fermentação com *Saccharomyces* para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja. Lisboa: ISA, 2017, 108 p. Dissertações de Mestrado.

Gluten Zero (2020). GZSearch. Disponível em: <https://www.glutenzero.pt/gluten-zero-app/>. Acesso em: 23/03/2020.

Grassi, S., Amigo, J. M., Lyndgaard, C. B., Foschino, R., & Casiraghi, E. (2014). Beer fermentation: Monitoring of process parameters by FT-NIR and multivariate data analysis. *Food Chemistry*, 155, 279–286. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.01.060.

Guerdrum, L. J., & Bamforth, C. W. (2011). Levels of gliadin in commercial beers. *Food Chemistry*, 129(4), 1783–1784. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.06.021>.

Hager, A. S., *et al.* (2014). Gluten free beer - A review. *Trends in Food Science and Technology*, 36(1), 44–54. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.01.001>.

Hutkins, R. W. (2006). *Microbiology and Technology of Fermented Foods* (1 st.). Blackwell Publishing.

Jecas Brewery (2014). Você conhece a roda dos sabores de cerveja?. Disponível em: <http://jecabrewery.blogspot.com/2014/05/voce-conhece-roda-dos-sabores-de-cerveja.html>. Acesso em: 14/07/2020.

Johnson, J., & Wallace, T. (2019). Whole Grains and their Bioactives (1st. ed). Barrington, IL, USA: © 2019 John Wiley & Sons Ltd, 498 p. <https://doi.org/10.1002/9781119129486>.

Kreis, S. (2009). Ch 06 Malting. In Handbook of Brewing. Processes, Technology, Markets (pp. 147–164).

Leroi, F. and Pidoux, M. (1993), Detection of interactions between yeasts and lactic acid bacteria isolated from sugary kefir grains. Journal of Applied Bacteriology, 74: 48-53. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1993.tb02995.x>.

Lewis, M. J., & Young, T. W. (2002). Brewing. In Biotechnology (2nd ed.). Aspen Publishers, Inc. <https://doi.org/10.1002/9783527620920.ch11>.

MacLeod, A. M. (1953). Studies on the Free Sugars of the Barley Grain: Iv. Low-Molecular Fructosans. Journal of the Institute of Brewing, 59(6), 462–469. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1953.tb06210.x>.

Mallet, J. (2014). Malt A Practical Guide from Field to Brewhouse. In Journal of Chemical Information and Modeling (Vol. 53, Issue 9). Brewers Publications. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

Mongozo Beers (2020). Gluten-Free. Disponível em: <https://www.mongozo.com/en/gluten-free>. Acesso em: 24/03/2020.

Nance, M. R., & Setzer, W. N. (2011). Volatile components of aroma hops (*Humulus lupulus L.*) commonly used in beer brewing. Journal of Brewing and Distilling, 2(April), 16–22.

Neumarkter Lammsbräu (2020). Glutenfrei. Disponível em: <https://www.lammsbraeu.de/bio-bier/glutenfrei/lammsbraeu-glutenfrei>. Acesso em: 25/03/2020.

Osorio, C. E., Mejías, J. H., & Rustgi, S. (2019a). Gluten detection methods and their critical role in assuring safe diets for celiac patients. Nutrients, 11(12), 17–20. <https://doi.org/10.3390/nu11122920>.

Palmer, G. H. (2017). Barley and malt. In Handbook of Brewing, Third Edition (pp. 107–128). <https://doi.org/10.1201/9781351228336>.

Palmer, J., & Kaminski, C. (2013). Water: A Comprehensive Guide for Brewers. In I (Vol. 53, Issue technology).

Peyer, L. C. (2017). Lactic acid bacteria fermentation of wort as a tool to add functionality in malting, brewing and novel beverages Thesis presented by Lorenzo Peyer MSc in Food Processing For the degree of. PhD Thesis.

Pinto, A. R. M. (2013). Avaliação do processo de secagem no fabrico de malte. Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, Portugal.

Pires, E. J., *et al.* (2014). Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>.

Priest, F. G., & Stewart, G. G. (2006). Handbook of Brewing. In *Handbook of Brewing* (2nd ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420015171>.

Quain, D. E. (2006). 8 - Yeast supply and propagation in brewing. In C. W. B. T.-B. Bamforth (Ed.), *Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition* (pp. 167–182). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1533/9781845691738.167>.

Reinold, M. R. (1997). Manual prático de cervejaria. Aden Editora e Comunicacoes, 1, 1–149.

Riedenburger Brauhaus (2020). Gluten Free Millet Beer. Disponível em: <https://www.riedenburger.eu/startseite/biere/riedenburger-biere/unsere-urgetreidebiere/glutenfreies-hirsebier.html>. Acesso em: 24/03/2020.

Ripari, V., Tomassetti, M., Cecchi, T. *et al.* Recipe, volatiles profile, sensory analysis, physico-chemical and microbial characterization of acidic beers from both sourdough yeasts and lactic acid bacteria. *Eur Food Res Technol* 244, 2027–2040 (2018).

Rouse, S., & Van Sinderen, D. (2008). Bioprotective potential of lactic acid bacteria in malting and brewing. *Journal of Food Protection*, 71(8), 1724–1733. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.8.1724>.

Schäer Gluten-Free (2020). Celiac vs. Gluten Intolerance: Is There a Difference Between Celiac Disease and Gluten Intolerance? Disponível em: <https://www.schaer.com/en-us/a/celiac-vs-gluten-intolerance>. Acesso em: 3/07/2020.

Scherf, K. A., & Poms, R. E. (2016). Recent developments in analytical methods for tracing gluten. *Journal of Cereal Science*, 67, 112–122. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2015.08.006>.

Scherf, K. A., Wieser, H., & Koehler, P. (2018). Novel approaches for enzymatic gluten degradation to create high-quality gluten-free products. *Food Research International*, 110, 62–72. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.021>.

Speidel (2020). Braumeister. Disponível em: https://www.speidels-braumeister.de/de/braumeister/braumeister-10-20-50-liter.html?gclid=EAlaIqobChMlt4basZLN7AIVuBoGAB2hCAcVEAAYASAAEgJPTPD_BwE. Acesso em: 8/08/2020.

Strong, G., & England, K. (2015). Beer Style Guidelines. Brewers Association, 93. <https://s3-us-west-2.amazonaws.com/brewersassoc/wp-content/uploads/2017/05/2017-BA-Beer-Style-Guidelines.pdf>.

Super Bock (2020). Super Bock sem glúten. Disponível em: <https://www.superbock.pt/pt/pt/products/#super-bock-sem-gluten?modal=super-bock-sem-gluten-read-more>. Acesso em: 30/11/2020.

Tefera, M. e Admassie, M. Production and Characterization of Malt and Beer Produced From Wheat Varieties, 08 December 2020, PREPRINT (Version 1) available at Research Square <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-120582/v1>.

Tefera, M. e Admassie, M. Production and Characterization of Malt and Beer Produced From Wheat Varieties, 08 December 2020, PREPRINT (Version 1) available at Research Square [<https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-120582/v1>].

Vassiliou, A. (2009). Regulamento (CE) n.º 41/2009: relativo à composição e rotulagem dos géneros alimentícios adequados a pessoas com intolerância ao glúten. Bruxelas: Jornal Oficial da União Europeia.

Watson, H. G., *et al.* (2018). Variation in gluten protein and peptide concentrations in Belgian barley malt beers. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(2), 148–157. <https://doi.org/10.1002/jib.487>.

Watson, H. G., *et al.* (2019). Applicability of different brewhouse technologies and gluten-minimization treatments for the production of gluten-free (barley) malt beers: Pilot- to industrial-scale. *Journal of Food Engineering*, 245, 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.09.015>.

Wrigley, C. W., & Batey, I. L. (2010). Cereal grains: Assessing and managing quality. In *Cereal Grains: Assessing and Managing Quality*. <https://doi.org/10.1533/9781845699529>.

Yong, T. C., Chiu, C. S., & Chen, C. N. N. (2019). Optimization of a simple, accurate and low cost method for starch quantification in green microalgae. *Botanical Studies*, 60(1). <https://doi.org/10.1186/s40529-019-0273-y>.

Yu, C., Wang, Y., Cao, H., Zhao, Y., Li, Z., Wang, H., Chen, M., & Tang, Q. (2020). Simultaneous Determination of 13 Organic Acids in Liquid Culture Media of Edible Fungi Using High-Performance Liquid Chromatography. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2817979>.

Zainasheff, J., & White, C. (2019). Yeast: the practical guide to beer fermentation. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53, Issue 9). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

7. Anexos

Anexo I: Curvas de calibração HPLC

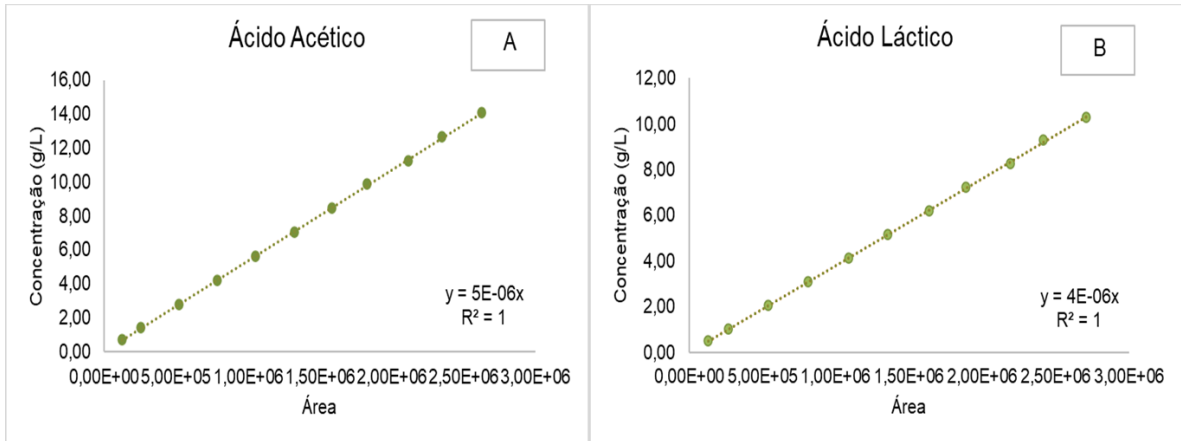


Figura 19: Retas de calibração do ácido acético (A) e ácido láctico (B) determinados por HPLC.

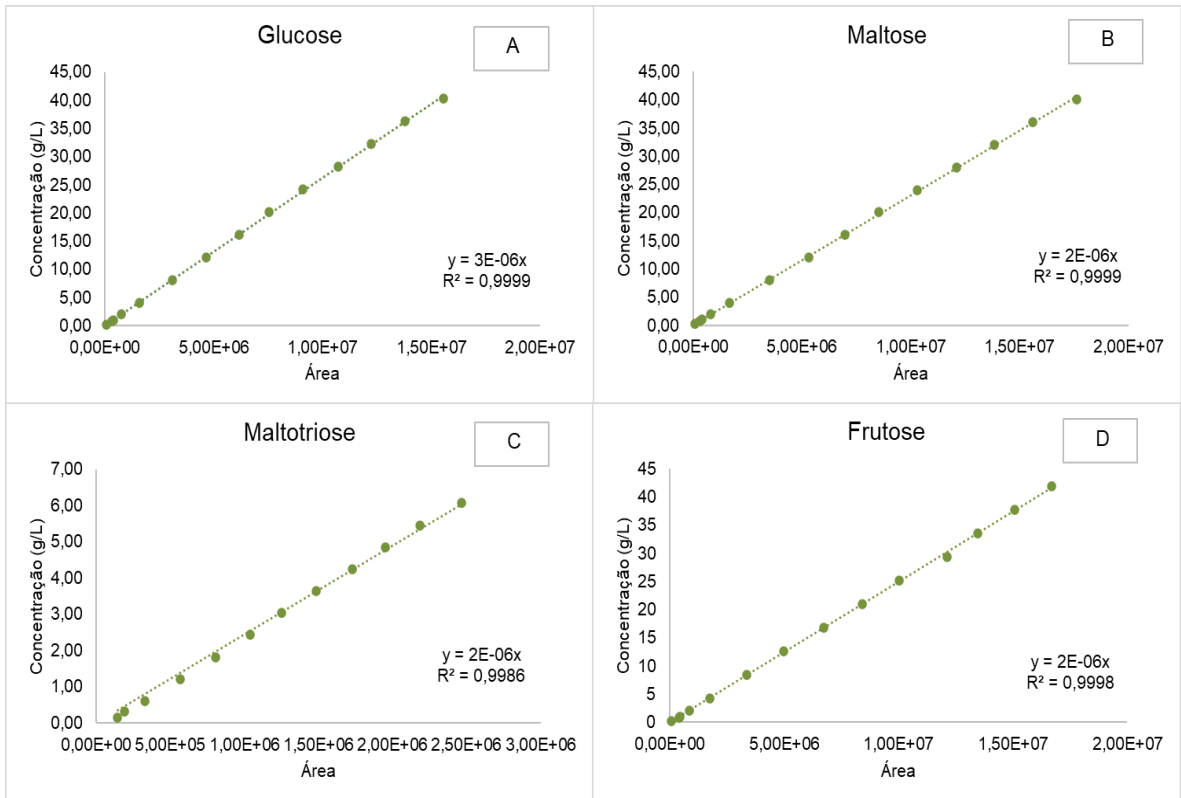


Figura 20: Retas de calibração da glucose (A), maltose (B), maltotriose (C) e frutose (D) determinadas por HPLC.

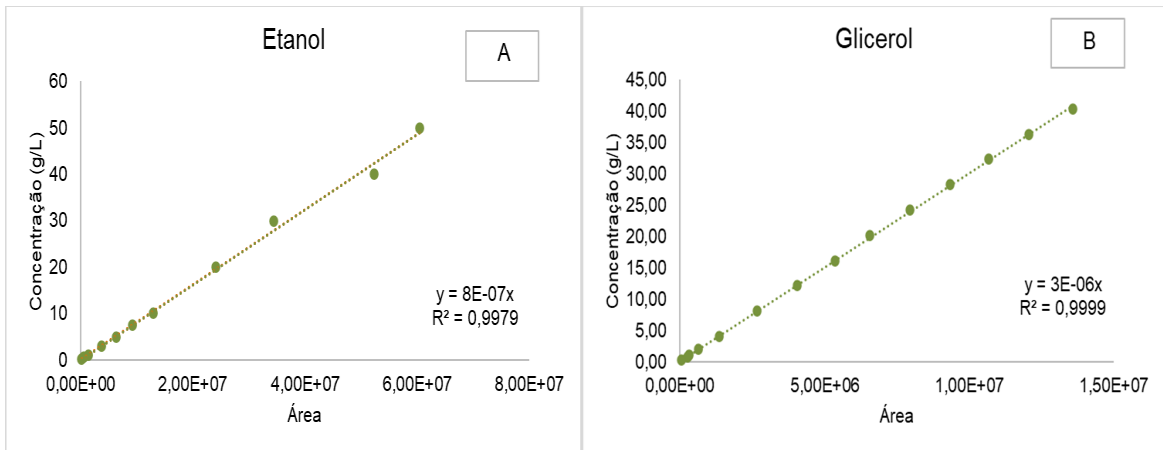


Figura 21: Retas de calibração do etanol (A) e glicerol (B) determinadas por HPLC.

Anexo II: Amido

Preparação das soluções:

- Solução de KOH (2 M): o peso molecular do KOH é 56,1 g/mol, de modo a preparar uma solução com 2 mol/L deverá adicionar-se 112,2 g de KOH a um litro de água destilada.
- Solução PBS (*Phosphate buffer saline*): para a preparação desta solução é necessário preparar, de forma independente, duas soluções: solução A e B. A solução A (de K_2HPO_4 a 0,2 M), para um litro de solução é constituída por 34,8 g de K_2HPO_4 , enquanto que para a solução B (de KH_2PO_4 0,2 M) necessita de 27,2 g para perfazer o mesmo volume. Para a preparação do PBS com pH 6,9; mistura-se 50,1 mL da solução A com 49,9 mL da solução B. Por fim, deve-se confirmar o valor do pH da solução PBS, que deve ser de 6,9.
- Ainda para a quantificação do amido, preparou-se uma solução com 50 mL de PBS juntamente com 20 mg de α -amilase (2,5 MU da Sigma).
- Solução de DNS (*Dinitrosalicylic Acid Solution*): dissolver 10 g de ácido 3,5-dinitrosalicílico em 500 mL de água destilada. Sob agitação, adicionar-se lentamente 30 g de tartarato de sódio e potássico tetrahidratado e acrescentar 16 g de NaOH. Perfazer com água destilada até ao volume final de um litro. De forma a que essa solução seja protegida da luz deve-se envolver o recipiente com folhas de alumínio e mantê-la num local protegido da luz.

Para efetuar a leitura das concentrações de amido presente em cada amostra, foi previamente construída uma reta de calibração utilizando glucose de concentrações conhecidas. Esta reta apresenta-se na Figura 22.

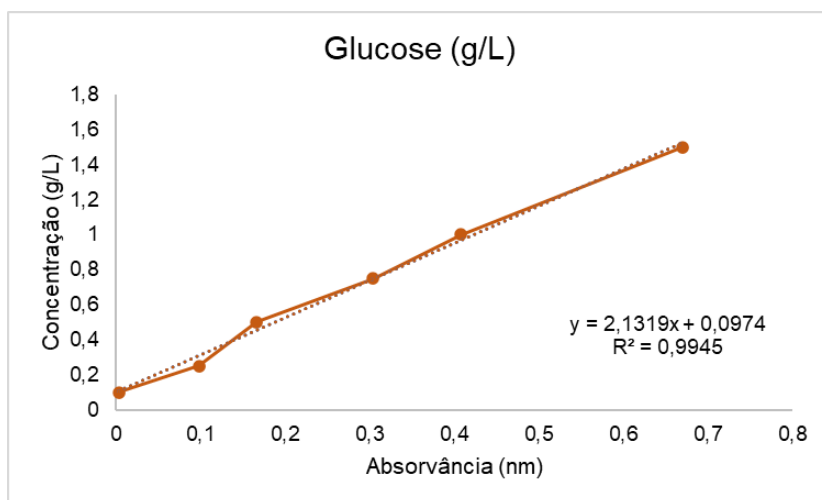


Figura 22: Reta de calibração de glucose efetuada para a determinação do teor de amido nas amostras antes e após fermentação.

Anexo III: Curva de Calibração da Gliadina para o método de quantificação do glúten

Curva de Calibração Gliadina

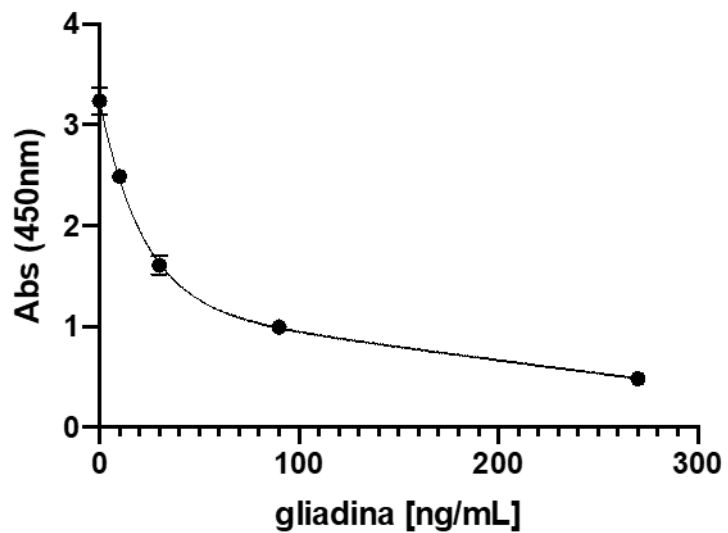


Figura 23: Curva de calibração de gliadina para a quantificação do teor de glúten das amostras em estudo.

Anexo IV: Prova de análise sensorial de cervejas

Indicações e dados pessoais

POR FAVOR LEIA TODAS AS INSTRUÇÕES ATENTAMENTE.

A seguinte prova de análise sensorial de cervejas do estilo *Weissbier* (cerveja à base de trigo) insere-se no âmbito da realização de uma dissertação de mestrado em Engenharia Alimentar. Por favor, não comente as suas opiniões até que todas as pessoas do seu grupo/agregado tenham efetuado e submetido a prova, de forma a não influenciar nem comprometer a opinião de cada um. Caso seja ALÉRGICO e/ou INTOLERANTE ao GLÚTEN, deverá informar o responsável pela prova, antes da análise sensorial.

Uma vez que nos encontramos nesta crise pandémica, a presente prova não poderá ser realizada numa sala de prova adequada ao efeito. De forma a superar esta situação inconveniente que limita a análise sensorial, pedindo desde já desculpa, esta prova deverá ser realizada num local calmo, silencioso, luminoso e sem estímulos (presença de outras pessoas, presença de produtos alimentares que a prova não permita, som da televisão ou música).

Antes de iniciar a prova certifique-se que tem à sua frente três copos de vidro transparentes identificados com os códigos das amostras, um copo com água e, se possível, rodelas de maçã ou bolachas *crackers* (de água e sal) - tudo isto será facultado pela responsável da prova. Muito obrigada pela sua colaboração!

Data de realização da prova: ____/____/____.

Idade:

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| <input type="radio"/> 18-25 | <input type="radio"/> 56-65 |
| <input type="radio"/> 26-35 | <input type="radio"/> 66-79 |
| <input type="radio"/> 36-55 | <input type="radio"/> >80 |

Com que frequência consome cerveja:

- | | |
|--|---|
| <input type="radio"/> Diariamente | <input type="radio"/> Várias vezes ao mês |
| <input type="radio"/> Várias vezes por semana | <input type="radio"/> Algumas vezes por mês |
| <input type="radio"/> Algumas vezes por semana | <input type="radio"/> Raramente |

Análise Sensorial de Cervejas

Irá receber três amostras de cerveja. Registe/memorize o código das amostras presentes no topo das folhas de prova, de modo a não repetir a avaliação e responda adequadamente aos atributos em avaliação.

Código da amostra:

- TE8
- D3F
- 1XC

Por favor, beba água antes de provar o produto de modo a limpar o palato e eliminar qualquer sabor presente na boca (como por exemplo o da análise efetuada anteriormente).

Amostra ____. Servida a bebida faça uma atenta observação, cheire e prove. De seguida, responda às seguintes questões de acordo com a sua opinião.

Cor	Claridade	Formação e Retenção de Espuma	Aroma
○ Muito agradável	○ Translúcido	○ Muito agradável	○ Muito agradável
○ Agradável	○ Claro	○ Agradável	○ Agradável
○ Indiferente	○ Ligeira	○ Indiferente	○ Indiferente
○ Desagradável	○ turbidez	○ Desagradável	○ Desagradável
○ Muito desagradável	○ Turvo	○ Muito desagradável	○ Muito desagradável
	○ Opaco		
Sabor	Carbonatação	Apreciação global	Intenção de Compra
○ Muito agradável	○ Carbonatada	○ Muito agradável	○ Compraria de certeza
○ Agradável	○ Ligeiramente carbonatada	○ Agradável	○ Provavelmente compraria
○ Indiferente	○ Ausente	○ Indiferente	○ Não sei se compraria
○ Desagradável	○ (morta)	○ Desagradável	○ Provavelmente não compraria
○ Muito desagradável		○ Muito desagradável	○ Não compraria de certeza

Observações:

Provadas as 3 amostras, ordene-as (TE8, D3F, 1XC) consoante a sua apreciação.

	TE8	D3F	1XC
1ª opção (mais apreciada)			
2ª opção			
3ª opção (menos apreciada)			

Existem amostras idênticas? Se sim, indique quais.

Tem alguma observação geral que possa complementar esta avaliação?

Muito obrigada pela sua disponibilidade!