



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



**ANTONIO FÁBIO REIS FIGUEIRÊDO**

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS E PRODUÇÃO DE CERVEJA  
ARTESANAL SUPLEMENTADA COM SELÊNIO**

Feira de Santana, BA.

2017

**ANTONIO FÁBIO REIS FIGUEIRÊDO**

**SELEÇÃO DE LEVEDURAS E PRODUÇÃO DE CERVEJA  
ARTESANAL SUPLEMENTADA COM SELÊNIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias

Co-orientador: Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho

Feira de Santana, BA.

2017

À elas, Jaciára (minha mãe) e Eloisa (minha avó), que abriram a minha mente, me conduzindo com maestria e inteligência ao caminho dos estudos, eu **DEDICO!**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, sem o qual nada seria possível;

A minha mãe Jaciára, exemplo de vida;

Ao meu irmão Vinícius, pela amizade e parceria;

A minha esposa Val e minha filha Beatriz, pelo amor, companheirismo e paciência durante minhas ausências;

Ao Prof. Dr. João Carlos Teixeira Dias por ter confiado na minha capacidade em realizar este trabalho, bem como pela orientação;

Ao Prof. Dr. Giovani Brandão Mafra de Carvalho, pela co-orientação e ensinamentos sobre a Tecnologia Cervejeira;

A Profa. Dra. Ana Paula Trovatti Uetanabaro, pelo incentivo e disponibilidade em todos os momentos;

Ao Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos, por todo o apoio e disponibilidade sempre que necessitei;

A toda a equipe do LABMA, em especial à Poly, pela imprescindível ajuda sempre que necessitei, bem como a Camilinha, IC extremamente dedicada;

Aos mais que funcionários e sim amigos, Neila, Danilo, Jeferson, Dilton e em especial Cláudio, pela convivência e amizade incomparável;

Ao laboratório da Planta Cervejeira da Escola de Engenharia de Lorena – USP, em especial ao Prof. Dr. João Batista, bem como o doutorando Orerves;

A Profa. Dra. Tatiana Saint’Pierre, por disponibilizar o laboratório LABSPECTRO - PUC/RJ, e em especial a Jefferson e Rafael pela disponibilidade e ensinamentos para a realização das análises de selênio;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UEFS, pela oportunidade de realização do curso;

A UESC, pela liberação para realizar o curso;

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, o meu **MUITO OBRIGADO!**

*“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais  
retornará ao seu tamanho original!”*

*Albert Einstein*

# SELEÇÃO DE LEVEDURAS E PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL SUPLEMENTADA COM SELÊNIO

## RESUMO

O uso de leveduras selecionadas constitui aspecto relevante na produção de cervejas de qualidade, pois além da produção de etanol e gás carbônico contribuem significativamente para a formação de compostos secundários, os quais conferem o *flavor* da cerveja. Estas leveduras também se estabelecem facilmente no meio, evitando contaminações indesejadas, além de apresentarem, geralmente, altas taxas de rendimento, produtividade e eficiência na fermentação. O selênio (Se) é um mineral que desempenha funções antioxidantes, sendo essencial como elemento traço à saúde humana e a sua deficiência está correlacionada à ocorrência de várias doenças. Devido a estas propriedades, a incorporação do Se em alguns alimentos e/ou suplementos alimentares associados a leveduras já é uma realidade. Considerando que a cerveja constitui a bebida alcoólica mais consumida no mundo, esta pesquisa objetivou selecionar leveduras para produzir cerveja artesanal suplementada com selênio. Para tanto, a partir do uso da técnica de análise multivariada, inicialmente foi realizada a seleção de leveduras com potencial para produção de cerveja, sendo selecionadas três cepas (SC52, SC57 e SC82); em seguida, aplicando o planejamento fatorial Doehlert e utilizando a técnica de Metodologia de Superfície de Respostas, realizou-se a otimização dos parâmetros fermentativos (temperatura de fermentação e concentração de selênio) para a produção de cerveja suplementada com selênio. As leveduras SC52 e SC82 apresentaram respostas significativas para a produção da cerveja suplementada, sendo que os valores ótimos (concentração de Se e Temperatura de fermentação) obtidos foram de 11 mg L<sup>-1</sup> e 25,0 °C para a levedura SC52 e 12 mg L<sup>-1</sup> e 23,5 °C para a levedura SC82; por fim, foram produzidas duas cervejas artesanais suplementadas com selênio (CSeSC52 e CSeSC82) em escala de microcervejaria, sendo avaliados os parâmetros fermentativos do processo e quantificados o selênio total e as espécies de selênio presentes nas leveduras e nas cervejas. As cervejas produzidas apresentaram resultados fermentativos dentro dos padrões comerciais, sendo recomendado em virtude da DDR (Dose Diária Recomendada) de Se, um consumo máximo de aproximadamente 600 mL da cerveja CSeSC52 e 740 mL da cerveja CSeSC82.

**PALAVRAS CHAVE:** seleção de leveduras, cerveja artesanal; selênio

# YEAST SELECTION AND PRODUCTION OF CRAFT BEER SUPPLEMENTED WITH SELENIUM

## ABSTRACT

The use of selected yeasts is an important aspect in the production of quality beers, since in addition to the production of ethanol and carbon dioxide they contribute significantly to the formation of secondary compounds, which confer the flavor of the beer. These yeasts also settle easily in the middle, avoiding undesired contaminations, in addition to generally presenting high rates of yield, productivity and fermentation efficiency. Selenium (Se) is a mineral that performs antioxidant functions, being essential as trace element to human health and its deficiency is correlated to the occurrence of several diseases. Due to these properties, the incorporation of Se into some food and / or food supplements associated with yeast is already a reality. Considering that beer is the most consumed alcoholic drink in the world, this research aimed to select yeasts to produce artisan beer supplemented with selenium. To do so, using the multivariate analysis technique, the selection of yeasts with potential for brewing was initially performed, and three strains (SC52, SC57 and SC82) were selected; Then applying the Doehlert factorial design and using the Response Surface Methodology technique, the optimization of the fermentation parameters (fermentation temperature and selenium concentration) for the production of beer supplemented with selenium was carried out. The yeasts SC52 and SC82 presented significant responses for the production of the supplemented beer, and the optimum values (Se concentration and fermentation temperature) were 11 mg L<sup>-1</sup> and 25.0° C for yeast SC52 and 12 mg L<sup>-1</sup> and 23.5° C for yeast SC82; (CSeSC52 and CSeSC82) were produced on a microbrewery scale, the fermentation parameters of the process were evaluated and total selenium and selenium species present in yeast and beers were quantified. The beers produced presented fermentative results within the commercial standards, being recommended by DDR (Recommended Daily Dose) of Se, a maximum consumption of approximately 600 mL of CSeSC52 beer and 740 mL of CSeSC82 beer.

**KEYWORDS:** yeast selection, craft beer; selenium

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vii</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1.1 HIPÓTESES</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2 OBJETIVO GERAL</b>	<b>18</b>
<b>1.1.2.1 Objetivos Específicos</b>	<b>18</b>
<b>1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1 MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE CERVEJA</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1.1 Água</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1.2 Malte</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1.3 Lúpulo</b>	<b>20</b>
<b>1.2.1.4 Leveduras Cervejeiras</b>	<b>21</b>
<b>1.2.1.5 Adjuntos</b>	<b>23</b>
<b>1.2.2 PRODUÇÃO DE CERVEJAS</b>	<b>24</b>
<b>1.2.2.1 Produção do Mosto</b>	<b>24</b>
<b>1.2.2.2 Processo Fermentativo</b>	<b>27</b>
<b>1.2.2.3 Acabamento ou Pós-Tratamento</b>	<b>29</b>
<b>1.2.3 O SELÊNIO</b>	<b>31</b>
<b>1.2.3.1 O Selênio e a Saúde Humana: Essencialidade <i>Versus</i> Toxicidade</b>	<b>32</b>
<b>1.2.3.2 Suplementação do Selênio por Leveduras</b>	<b>33</b>
<b>1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>34</b>
<b>CAPÍTULO 2 - APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL CERVEJEIRO</b>	<b>39</b>
<b>RESUMO</b>	<b>40</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>41</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b>	<b>42</b>
<b>2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>44</b>
<b>2.2.1 LEVEDURAS CERVEJEIRAS</b>	<b>44</b>
<b>2.2.2 ANÁLISE MULTIVARIADA</b>	<b>45</b>
<b>2.2.2.1 Análise de Componentes Principais (ACP)</b>	<b>46</b>
<b>2.2.2.2 Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH)</b>	<b>46</b>
<b>2.2.2.3 Redes Neurais Artificiais – RNA</b>	<b>46</b>
<b>2.2.2.3.1 Mapa Auto-Organizável de Kohonen (SOM)</b>	<b>48</b>
<b>2.3 OBJETIVO GERAL</b>	<b>49</b>
<b>2.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>49</b>
<b>2.4 METODOLOGIA</b>	<b>49</b>
<b>2.4.1 LEVEDURAS</b>	<b>49</b>

2.4.2	MOSTO CERVEJEIRO	50
2.4.3	CULTIVO E PROPAGAÇÃO DE LEVEDURAS	51
2.4.4	FERMENTAÇÃO	51
2.4.5	ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO DO EXPERIMENTO	52
2.4.6	METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS E SELEÇÃO DAS LEVEDURAS	53
2.3.7	ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS	53
2.5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	53
2.5.1	CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR	53
2.5.2	EXTRATO APARENTE, PRODUÇÃO DE ETANOL E GRAU APARENTE DE FERMENTAÇÃO	57
2.5.3	CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES E GLICEROL	60
2.5.4	SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL CERVEJEIRO	62
2.6	<b>CONCLUSÕES</b>	66
2.7	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	67

### **CAPÍTULO 3 - OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA SUPLEMENTADA COM SELÊNIO**

	<b>RESUMO</b>	71
	<b>ABSTRACT</b>	72
3.1	<b>INTRODUÇÃO</b>	74
3.2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	76
3.2.1	SELÊNIO	76
3.2.2	LEVEDURA	76
3.2.3	MOSTO CERVEJEIRO	77
3.2.4	FERMENTAÇÃO	77
3.2.5	GRAU APARENTE DE FERMENTAÇÃO (GAF) E PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA EM ETANOL (Qp)	79
3.2.6	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	79
3.2.7	SIGNIFICÂNCIA DOS EXPERIMENTOS	81
3.3	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	82
3.3.1	GRAU APARENTE DE FERMENTAÇÃO	82
3.3.2	PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA EM ETANOL	87
3.3.3	VALIDAÇÃO DOS MODELOS	90
3.4	<b>CONCLUSÕES</b>	91
3.5	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	92

### **CAPÍTULO 4 - CERVEJA ARTESANAL SUPLEMENTADA COM SELÊNIO: SELÊNIO TOTAL E BIOESPECIAÇÃO**

	<b>RESUMO</b>	94
	<b>ABSTRACT</b>	95
4.1	<b>INTRODUÇÃO</b>	97
4.2	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	98

<b>4.2.1</b>	<b>INSTRUMENTAÇÃO</b>	<b>98</b>
<b>4.2.2</b>	<b>REAGENTES E MATERIAIS</b>	<b>100</b>
<b>4.2.3</b>	<b>PRODUÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO</b>	<b>101</b>
<b>4.2.4</b>	<b>FERMENTAÇÃO</b>	<b>102</b>
<b>4.2.5</b>	<b>DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO TOTAL POR DRC-ICP-MS</b>	<b>104</b>
<b>4.2.6</b>	<b>DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE SELÊNIO POR HPLC-ICP-MS</b>	<b>104</b>
<b>4.2.7</b>	<b>VALIDAÇÃO DO MÉTODO</b>	<b>104</b>
<b>4.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>105</b>
<b>4.3.1</b>	<b>CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO</b>	<b>105</b>
<b>4.3.2</b>	<b>SELÊNIO TOTAL</b>	<b>107</b>
<b>4.3.3</b>	<b>QUANTIFICAÇÃO DE SELENOCOMPOSTOS</b>	<b>108</b>
<b>4.4</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>111</b>
<b>4.5</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>112</b>
	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>114</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Fluxograma do processo produtivo de cerveja artesanal puro malte	24
Figura 1.2 -	Ilustração do grão do malte inteiro (A) e moído (B)	25
Figura 2.1 -	Processo simplificado de fabricação de cerveja	43
Figura 2.2 -	Exemplo de agrupamento realizado aplicando SOM	48
Figura 2.3 -	Crescimento celular de leveduras, fermentadas à temperatura de 15°C	55
Figura 2.4 -	Crescimento celular de leveduras, fermentadas à temperatura de 22°C	56
Figura 2.5 -	Consumo de Extrato Aparente e Produção de Etanol, por leveduras em fermentação à 15 °C e à 22 °C	59
Figura 2.6 -	Teores de glicerol e produção de etanol, em fermentação realizada nas temperaturas de 15 °C (A) e 22 °C (B)	62
Figura 2.7 -	Análise de Componentes Principais; (A) fatores/parâmetros de avaliação e (B) leveduras agrupadas	63
Figura 2.8 -	Análise de Agrupamentos Hierárquicos; (A) grupo de fatores/parâmetros de avaliação e (B) leveduras agrupadas	63
Figura 2.9 -	Matriz U – Mapa 5 x 8 com 6 variáveis	64
Figura 2.10 -	Variáveis utilizadas para a construção dos Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen (SOM)	65
Figura 2.11 -	Agrupamento e seleção de leveduras com potencial cervejeiro	65
Figura 3.1 -	Desenho esquemático da fermentação do mosto puro malte, com adição de selênio	78
Figura 3.2 -	Diagrama de Pareto das interações das variáveis Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> e Temperatura para os fatores/respostas Grau Aparente de Fermentação e Produtividade Volumétrica em Etanol	85
Figura 3.3 -	Curvas de contorno (A, C e E) e Superfície de resposta (B, D e F) referente à variável resposta Grau Aparente de Fermentação para a levedura SC52, SC57 e SC82	86
Figura 3.4 -	Curvas de contorno (A, C e E) e Superfície de resposta (B, D e F) referente à variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol para as leveduras SC52, SC57 e SC82	89
Figura 4.1 -	Velocidades específicas de crescimento de células em suspensão (μX - ■), consumo de extrato aparente (μS - ●) e produção de etanol (μP - ▲), na fermentação em mosto puro malte suplementado com selênio, com as leveduras SC52 (A) e SC82 (B)	106
Figura 4.2 -	Cromatograma obtido a partir de injeção de padrões analíticos em HPLC-ICP-MS	110
Figura 4.3 -	Cromatogramas das amostras de cerveja (carbonatada e não carbonatada) e de leveduras, em HPLC-ICP-MS	110

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1:	Relação de enzimas e suas condições ótimas de temperatura e pH para degradação de substratos durante a mosturação	26
Tabela 2.1:	Cepas de leveduras utilizadas no experimento e respectivos locais de origem	50
Tabela 2.2:	Rampa de mosturação com as respectivas temperaturas, tempos de ativação e enzimas ativadas	51
Tabela 2.3:	Valores médios e desvio padrão dos teores de extrato aparente, etanol e grau aparente de fermentação, obtidos em condições de fermentação a 15° C e 22° C em mosto cervejeiro puro malte	58
Tabela 2.4:	Teores de maltose, maltotriose e glicerol em fermentações em mosto puro malte (12 °P) com leveduras selecionadas e comerciais, nas temperaturas de 15 °C ( <i>lager</i> ) e 22 °C ( <i>ale</i> ), ao término do processo fermentativo	60
Tabela 3.1:	Rampa de mosturação com as respectivas temperaturas, tempos de ativação e enzimas ativadas	77
Tabela 3.2:	Matriz de planejamento experimental Doehlert 3x5 com duas repetições do ponto central e respectivos níveis utilizados	81
Tabela 3.3:	Matriz de planejamento fatorial Doehlert 3x5 com duas repetições no ponto central, considerando as fermentações realizadas com as leveduras SC52, SC57 e SC82	82
Tabela 3.4:	Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC52 e variável resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA)	83
Tabela 3.5:	Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC57 e variável resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA)	83
Tabela 3.6:	Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC52 e variável resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA)	83
Tabela 3.7:	Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC52 e variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)	87
Tabela 3.8:	Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC57 e variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)	87
Tabela 3.9:	Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC82 e variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)	87
Tabela 3.10:	Teste de validade dos modelos empíricos propostos para as variáveis resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA) e Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp), para a levedura SC52	90
Tabela 3.11:	Teste de validade dos modelos empíricos propostos para as variáveis resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA) e Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp), para a levedura SC82	90
Tabela 4.1:	Programa de decomposição do sistema HPA-S	99
Tabela 4.2:	ICP-MS – configurações instrumentais e condições de separação HPLC	99
Tabela 4.3:	Condições operacionais do ICP-MS	100
Tabela 4.4:	Temperaturas, tempos de ativação e enzimas ativadas, presentes no mosto cervejeiro	101
Tabela 4.5:	Produtividade volumétrica em etanol (Qp) e Rendimento Aparente	

	(Yp/s) em cervejas suplementadas com selênio CSeSC52 e CSeSC82	107
Tabela 4.6:	Selênio total nas cervejas produzidas e nas leveduras após fermentação.	108
Tabela 4.7:	Se <sub>TOTAL</sub> , SeMetSecys e SeMet, após fermentação, utilizando HPLC-ICP-MS	109

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
PPGBiotec	Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
UESC	Universidade Estadual de Santa Cruz
LABMA	Laboratório de Microbiologia Aplicada da Agroindústria
LAPEM	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia
SeMet	Selenometionina
SeMetSeCys	Selenometilselenocisteína
HPLC-ICP-MS	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência Acoplado a Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
DRC-ICP-MS	Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado com Célula de Reação Dinâmica
HPLC	Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
ICP-MS	Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado
MeSeCys	Selenometilselenocisteína
PIB	Produto Interno Bruto
DQO	Demanda Química de Oxigênio
DMS	Dimetil Sulfeto
DDR	Dose Diária Recomendada
SOM	Self Organizing Maps
RNA	Redes Neurais Artificiais
Et	Erro topográfico
EQ	Erro de quantização
S	Índice de <i>Silhouette</i>
DB	Índice <i>Davies-Bouldin</i>
CSB	Cabine de Segurança Biológica
GFA	Grau Aparente de Fermentação
ACP	Análise de Componentes Principais
AAH	Análise de Agrupamentos Hierárquicos
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	Selenito de sódio
Se	Selênio
Qp	Produtividade Volumétrica em Etanol
SeCys	Selenocisteína
SeMetSeCys	Selenomethylselenocysteine
Na <sub>2</sub> SeO <sub>4</sub>	selenato de sódio
HNO <sub>3</sub>	ácido nítrico
Yp/s	Rendimento Aparente ou fator de conversão de substrato em produto
Se <sub>TOTAL</sub>	Selênio total
HPA-S	High Pressure Ascher

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## 1.1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas do mundo, podendo ser definida como uma bebida carbonatada preparada a partir de água, malte de cevada, lúpulo e levedura, permitindo-se ainda o uso de outras matérias primas denominadas como adjuntos no processo de fabricação, quando se deseja conferir características “especiais”, seja do ponto de vista da tradição ou preferência local/regional.

No Brasil, a produção atual de cervejas é de 14 bilhões de litros, representando 1,6% do PIB, com consumo per capita de 66,9 litros/hab/ano (CERVBRASIL, 2016). As cervejas artesanais constituem um pequeno segmento de mercado, ao qual são destinados pequenos volumes de produção, entretanto com elevado valor agregado ao produto, haja vista as suas características sensoriais diferenciadas. A produção de cervejas artesanais ocupa atualmente 0,7% do volume total de cervejas no país, o que representa um volume de aproximadamente 91 milhões de litros anuais. Além disto, nos últimos anos, a taxa de crescimento está acima de 50 novas cervejarias artesanais por ano, o que representa em média uma nova cervejaria por semana (ICB, 2016).

Durante o processo de fabricação da cerveja, a fermentação é um ponto importante, sendo considerados fatores fundamentais: a temperatura; a escolha do inóculo, com cepas de qualidade; e o local, que deve ser apropriado para ocorrer o processo fermentativo (OETTERER & ALCARDE, 2006; CARVALHO et al., 2007). Dessa forma, a incorporação de cepas selecionadas, que contribuam para garantir a identidade e qualidade da cerveja produzida constitui uma etapa importante para o processo (GUIMARÃES, 2005; SILVA, et. al. 2009).

Para a produção de cerveja são utilizadas leveduras do gênero *Saccharomyces*, que estão distribuídas na espécie *S. cerevisiae*, as quais há milhares de anos também têm sido utilizadas pelos seres humanos em outros processos de fermentação, como produção de cachaça, vinho e pão. Estas leveduras são empregadas também como fontes alternativas de alto valor nutricional de proteínas, enzimas e vitaminas; como suplementos alimentares; para a produção de extratos e meios de cultura microbiológicos; bem como para a produção de novas linhagens que satisfaçam as demandas específicas das indústrias alimentícias (BEKATOROU, et. al., 2006).

O Selênio é considerado um elemento traço essencial e a sua deficiência está diretamente correlacionada a diversas enfermidades. A principal fonte de selênio para o homem é a alimentação, entretanto os solos cultivados (em sua grande maioria) apresentam baixos teores de selênio, o que por consequência incorre em baixos teores deste mineral nos alimentos, justificando o uso de suplementos alimentares.

O fornecimento de suplementos começou a ser adotado há mais de 2000 anos. A levedura usada pelos produtores de leveduras ricas em selênio é a *Saccharomyces cerevisiae*, que são capazes de converter selênio inorgânico em selenometionina (SeMet), a qual é a melhor fonte de selênio para os organismos, quando cultivadas em condições apropriadas (BARUSELLI, 2005; DERMICI & PORMETTO, 1999; SUHAJDA *et al.*, 2000; EFSA, 2008; SCHRAUZER, 2006).

Diante dos benefícios do selênio à saúde humana alguns trabalhos têm sido realizados visando a suplementação de alimentos e bebidas de forma a garantir que a população venha a ingerir as doses diárias recomendadas, sendo, portanto, o objetivo desta pesquisa produzir cerveja artesanal suplementada com selênio.

### 1.1.1 HIPOTEESES

Leveduras *Saccharomyces cerevisiae* em meio fermentativo enriquecido com selênio são capazes de absorvê-lo, biotransformando-o em compostos proteicos servindo como suplemento nutricional, e considerando ser este o principal microorganismo utilizado para a produção de cerveja é possível produzir cerveja suplementada com selênio.

### 1.1.2 OBJETIVO GERAL

Selecionar leveduras com potencial cervejeiro e produzir cerveja artesanal suplementada com selênio.

#### 1.1.2.1 **Objetivos Específicos**

- ✓ Selecionar por meio de técnicas de análise multivariada leveduras com potencial cervejeiro;
- ✓ Otimizar parâmetros fermentativos para produção de cerveja suplementada com selênio;
- ✓ Produzir cerveja suplementada com selênio e determinar os teores de selênio total e selenocompostos.

## 1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.2.1 MATÉRIAS PRIMAS UTILIZADAS NA PRODUÇÃO DE CERVEJA

A cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Parte do malte de cevada poderá ser substituída por adjuntos cervejeiros, cujo emprego é limitado a uma quantidade máxima. Consideram-se adjuntos cervejeiros a cevada cervejeira e os demais cereais aptos para o consumo humano, malteados ou não-malteados, bem como os amidos e açúcares de origem vegetal (BRASIL, 2009).

#### 1.2.1.1 Água

A água constitui um dos principais fatores a serem levados em consideração na fabricação de cervejas, constituindo o meio indispensável a todas as reações químicas e bioquímicas formadoras da cerveja. Do ponto de vista quantitativo é a principal matéria prima, visto que 92 a 95% do peso da cerveja é constituído de água (ALMEIDA e SILVA, 2005). Em termos qualitativos existem técnicas que permitem modificação da água, através da remoção ou adição de minerais (MORADO, 2009).

De acordo com Tschope (2001), a água cervejeira deve conter as seguintes características: “teor máximo de ferro = 1,0 ppm; teor máximo de manganês = 0,1 ppm; dureza total / teor máximo de carbonato de cálcio = 100,0 ppm; e oxigênio necessário para oxidar a matéria orgânica (DQO) – máximo = 2,0 ppm”. Se necessário, devem ser realizados tratamentos para torná-la adequada à indústria cervejeira, sendo que o controle microbiológico é indispensável (VENTURINI FILHO, 2000).

#### 1.2.1.2 Malte

O malte é obtido a partir da germinação de cereais, sendo que o utilizado nas cervejarias é obtido usualmente a partir de cevadas de variedades selecionadas especificamente para esta finalidade. A cevada é uma gramínea do gênero *Hordeum*, parente

próxima do trigo e sua cultura é efetuada em climas temperados. No Brasil é produzida em algumas partes do Rio Grande do Sul durante o inverno e na América do Sul a Argentina é a grande produtora (CARVALHO, 2007).

Outros cereais tais como o trigo, aveia, centeio podem ser malteados, mas a cevada é a mais utilizada por ser rica em amido e possuir um alto teor de proteínas em quantidade suficiente para fornecer os aminoácidos necessários para o crescimento da levedura, além de fornecer substâncias nitrogenadas que desenvolvem um papel importante na formação da espuma (CARVALHO, 2007).

Existem dois tipos principais de cevada: a de duas e a de seis fileiras. A primeira tem duas fileiras de grãos na mesma espiga e é a mais utilizada porque contém grãos maiores e mais uniformes. Essa mesma se subdivide em dois subgrupos principais: a cevada de haste ereta (*Hordeum distichum erectum*) e a cevada de haste curta (*Hordeum distichum nutans*) (CARVALHO, 2007). No Brasil a cevada cervejeira produzida nos estados do Sul apresenta duas fileiras (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

### 1.2.1.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta trepadeira têxtil típica de regiões frias dos EUA, Alemanha, República Tcheca, Polônia, Austrália, Nova Zelândia, Japão, China, Chile, Argentina e outros, mais precisamente entre os paralelos de latitude 35 e 55° (TSCHOPE, 2001). Pertence a família *Cannabaceae*, mas, apesar do parentesco com a *Cannabis*, não contém substâncias alucinógenas. O lúpulo é uma planta dióica, isto é, apresenta flores masculinas e femininas em indivíduos diferentes, não havendo, portanto, planta hermafrodita (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

O lúpulo é o responsável pelo aroma e amargor característicos da cerveja, sendo estes obtidos por meio da adição das flores femininas ou frutos delas decorrentes, que são ricas em glândulas amarelas contendo lupulina. Além de aroma e amargor, o lúpulo apresenta ação anticéptica, pois os ácidos isoalfa são bacteriostáticos; contribui também para a estabilidade do sabor e da espuma da cerveja (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

As partes mais importantes da lupulina são as resinas e os óleos essenciais. Os óleos essenciais do lúpulo concedem ao mosto e a cerveja o aroma típico do lúpulo. Apesar de ser volátil (96 – 98% se perdem por volatilização durante a fervura do mosto) a pequena fração restante, mesmo em concentração muito baixa, sofrerá uma providencial oxidação e dará o caráter aromático do lúpulo a cerveja. Os óleos essenciais do lúpulo se dividem em duas classes: os sesquiterpenos, de influencia positiva no aroma da cerveja (humuleno,  $\beta$ -cariofileno, farneseno, pós-humulono-1 e pós-humuleno 2) e os monoterpenos, de influência negativa para o aroma (mirceno, linalol e pirenos  $\alpha$  e  $\beta$ ) (TSCHOPE, 2001).

As resinas são constituídas principalmente de ácidos  $\alpha$  e  $\beta$ . Os primeiros, também chamados de humulonas, são a fonte principal de amargor na cerveja; enquanto que os segundos, denominados lupulonas, são menos importantes. Durante a fervura do lúpulo no mosto, as moléculas de ácidos  $\alpha$  são isomerizadas para a forma de ácidos iso- $\alpha$ . Esses compostos, também conhecidos como iso-humulonas, são muito amargos e muito mais solúveis do que os ácidos  $\alpha$  (BENITEZ *et al.*, 1997).

O lúpulo é comercializado em três diferentes formas: em flor, pellets ou extrato. A flor naturalmente é pouco utilizada nos dias atuais, em virtude do prazo de validade, bem como do teor de resinas, quando comparada às outras formas. O formato em pellets contém o lúpulo em pó concentrado ou não, possibilita o fácil manuseio e automação na dosagem deste constituinte na etapa de cozimento do mosto. Como extrato, o lúpulo é moído e através de solventes orgânicos (hexano, metanol) extraem-se componentes amargos e óleos entéricos, que são novamente vaporizados. Essa última forma é a mais utilizada, devido à economia de espaço, por possuírem maiores densidades, além de permitir o armazenamento por períodos prolongados (KALNIN, 1999; REINOLD, 1990; VENTURINI FILHO, 2005).

#### 1.2.1.4 Leveduras Cervejeiras

As leveduras utilizadas na produção da cerveja pertencem ao gênero *Saccharomyces* e estão distribuídas na espécie *S. cerevisiae*, sendo responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, metabolizando os açúcares fermentescíveis para produzir álcool, gás carbônico, energia na forma de ATP e calor (CURI, 2006). As características de sabor e

aroma de qualquer cerveja são determinadas principalmente pelo tipo de levedura utilizada. São tão importantes que classificam as cervejas, sendo os dois principais tipos *Ale* ou *Lager*.

Leveduras *Ale* são predominantemente classificadas como *S. cerevisiae*, embora algumas cepas sejam, na verdade, híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* (GONZALEZ & QUEIROL, 2008). Já leveduras *Lager* são *S. pastorianus*, uma espécie domesticada, proveniente da fusão entre os genomas das espécies *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*, gerando um híbrido tetraploide. Portanto, *S. pastorianus* trata-se de uma espécie exclusiva do meio produtivo, e ausente naturalmente no ambiente (LIBKIND, *et. al.*, 2011). Os taxonomistas têm designado que todas as leveduras empregadas na produção de cerveja pertencem à espécie *S. cerevisiae* (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001; CARVALHO *et. al.*, 2006).

Entretanto, as leveduras *S. cerevisiae* tipo *ale* e *S. cerevisiae* tipo *lager* apresentam algumas diferenças bioquímicas, o que justifica manter uma diferenciação entre elas. As cepas de *S. pastorianus* tipo *lager* possuem os genes MEL que produzem a enzima extracelular  $\alpha$ -galactosidase (melibiase), permitindo a utilização do dissacarídeo melibiose (glicose-galactose). As cepas de *S. cerevisiae* tipo *ale* não possuem esses genes MEL, o que impossibilita a utilização da melibiose. Além disso, às cepas *ale* podem crescer a 37°C, enquanto as cepas *lager* não apresentam crescimento com temperaturas superiores a 34°C (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001; CARVALHO *et. al.*, 2006).

A cerveja *Lager*, é produzida por leveduras de baixa fermentação com temperatura que varia entre 7 e 15°C, as quais floculam no final da fermentação (7 a 10 dias), sendo coletadas na base do fermentador; este tipo de cerveja é elaborada com linhagens de *Saccharomyces pastorianus* sendo mais popular mundialmente. As leveduras de alta fermentação, usadas na produção de cervejas do tipo *Ale*, fermentam com temperaturas entre 18 e 22°C. No final da fermentação (3 a 5 dias) as células se elevam à superfície do líquido formando uma película flutuante e espessa de biomassa que podem ser retiradas desta superfície; as cervejas *Ale* são elaboradas com linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* sendo muito populares na Grã Bretanha. Embora exista esta diferenciação tecnológica no setor de cervejarias, geralmente a espécie de levedura cervejeira é a *Saccharomyces cerevisiae*, sendo que outras classificações são utilizadas para agrupar diferentes linhagens de *Saccharomyces* (DRAGONE *et. al.*, 2010; CARVALHO *et al.*, 2006; VARNAM & SUTHERLAND, 1994; VAUGHAN-MARTINI & MARTINI, 1993; ANDRIETTA *et. al.*, 1999).

A depender do estilo de cerveja, outras cepas podem ser utilizadas. Como exemplos, em cerveja tipo Lambics utiliza-se *Bretanomyces*, uma cepa de levedura selvagem que fermenta em conjunto com uma bactéria láctica; já em cerveja Bavarian weissbier (cerveja de trigo) emprega-se a levedura *Torulaspora deubrueckii* (BRIGS, *et. al.* 2004; EDWARD, 2009).

#### 1.2.1.5 Adjuntos

Os adjuntos na produção de cerveja podem ser definidos como qualquer fonte de carboidrato diferente do malte de cevada que contribui com açúcares para o mosto (STEWART, 1994). O uso de adjuntos para suplementar o mosto constitui uma prática de redução de custos empregada em várias cervejarias e microcervejarias (YOUNIS & STEWART, 1999).

De acordo com a sua composição química, os adjuntos podem ser classificados em amiláceos e açucarados. Tradicionalmente, o milho na forma de *grits* e arroz como quirera têm sido os mais utilizados pelas cervejarias em todo mundo, incluindo as do Brasil. Dentre os adjuntos açucarados sobressaem os xaropes de cereais, sendo o de milho o principal deles, o açúcar comum e o invertido (xarope de glicose e frutose) provenientes da cana-de-açúcar ou beterraba sacarina (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001).

Segundo Reitenbach (2010), o uso de adjuntos cervejeiros pode resultar em um produto com alta estabilidade física, melhor resistência ao resfriamento e maior brilho. A estabilidade física é devido ao fato de que os adjuntos comumente usados não contribuírem com material proteico, e sim, com carboidratos, o que é vantajoso para estabilidade coloidal. Os adjuntos, com exceção da cevada, tem pouca contribuição em compostos fenólicos.

A quantidade máxima de adjuntos de acordo com a legislação brasileira é de 45%, sendo que se passar disso, a cerveja deve se chamar “cerveja de [adjunto utilizado]”. O adjunto ideal depende do objetivo para o qual quer se adicioná-lo na formulação da bebida, mas de maneira geral, deve produzir açúcares fermentescíveis e dextrinas não fermentescíveis em proporções semelhantes às obtidas da cevada, e com incremento mínimo de proteínas solúveis. O máximo possível, dentro dessas possibilidades, é determinado ainda pela

capacidade das enzimas do malte em hidrolisar todo o amido contido nas matérias primas, e pela capacidade do malte de suprir a necessidade da levedura de nutrientes diversos, como o nitrogênio (REITENBACH, 2010).

## 1.2.2 PRODUÇÃO DE CERVEJAS

De acordo com Venturini Filho (2000) o processo de elaboração de cervejas pode ser dividido em três etapas: produção do mosto; processo fermentativo; e acabamento ou pós tratamento.

### 1.2.2.1 Produção do Mosto

Na Figura 1.1 são apresentadas as etapas de produção do mosto, que se inicia com a moagem do malte, um processo puramente físico que tem por objetivo promover a exposição do amido do endosperma além de aumentar a área superficial para ação das enzimas na próxima etapa (mosturação). Em virtude das cascas do malte serem utilizadas para filtrar o mosto, o malte é esmagado (e não triturado) entre rolos cilíndricos (CRUZ, 2007).

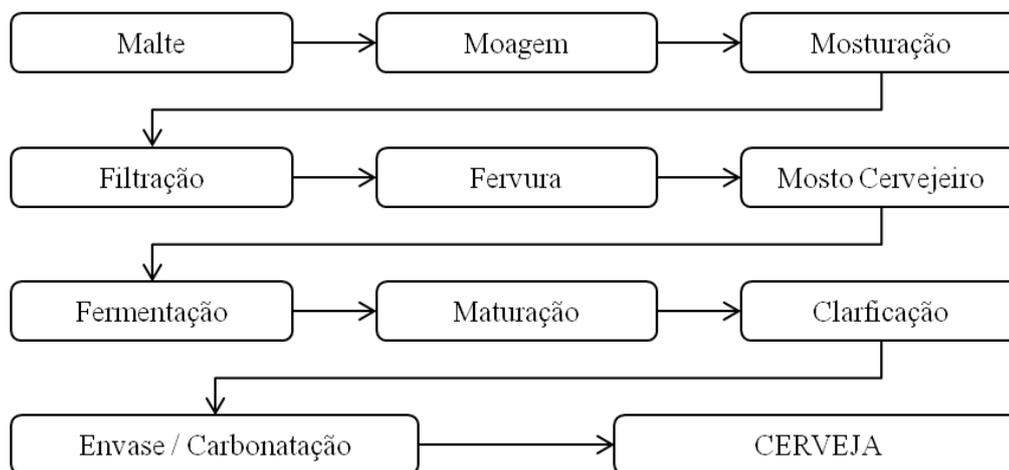


Figura 1.1 – Fluxograma do processo produtivo de cerveja artesanal puro malte

A **moagem do malte** é uma etapa muito importante, pois irá influenciar velocidade da transformação físico-química, o tempo de filtração do mosto, a ação das enzimas no amido e a qualidade do produto final. De acordo com Martins (1991), o grão do malte (Figura 1.2A) não

deve ficar em forma de farinha (muito fino) para evitar entupimento na filtração, nem muito grosso, para não dificultar a hidrólise do amido. Para Venturini Filho & Cereda (2008), um malte bem moído deve ter ausência de grãos inteiros, a maioria das cascas rasgadas longitudinalmente, o endosperma quebrado em partículas menores de tamanho uniforme e quantidade mínima de farinha (Figura 1.2B).



Figura 1.2 – Ilustração do grão do malte inteiro (A) e moído (B).

Após a moagem, a próxima etapa é a **mosturação ou brassagem**, que constituem termos utilizados pelos cervejeiros para o processo de embeber em água quente o malte. Tem por objetivo a hidratação do malte, utilizando controle de temperatura e pH, visando a ativação das enzimas presentes no malte. As amilases convertem o amido em açúcares fermentescíveis (maltose principalmente) e dextrina não fermentável; as proteases degradam as proteínas formando aminoácidos e peptídeos; e as fosfatases liberam íons de fósforo orgânico para o mosto (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2008).

Segundo Cereda (1983) e Martins (1991), as reações enzimáticas podem ser aceleradas em função do pH e da temperatura de ação de cada enzima. Desta forma, dependendo do estilo de cerveja que se deseja produzir, será necessário controlar o pH do mosto e ajustar o tempo e as temperaturas do processo de mosturação, além de definir os ingredientes em qualidade e quantidade. Na Tabela 1.1 são apresentadas as faixas ótimas de temperatura e de pH de atuação das diferentes enzimas no processo de mosturação.

Tabela 1.1: Relação de enzimas e suas condições ótimas de temperatura e pH para degradação de substratos durante a mosturação

<b>Enzimas</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>pH</b>	<b>Substrato</b>
Hemicelulases	40-45	4,5-4,7	Hemicelulose
Exopeptidases	40-50	5,2-8,2	Proteínas
Endopeptidases	50-60	5,0	Proteínas
Dextrinase	55-60	5,1	Amido
Beta-amilase	60-65	5,4-5,6	Amido
Alfa-amilase	70-75	5,6-5,8	Amido

Fonte: TSCHOPE, 2001.

Como visto anteriormente, diferentes enzimas possuem faixas de temperatura específicas de atuação em cada substrato; esta variabilidade gera perfis diferentes de moléculas de amido resultando, por sua vez, em açúcares com cadeias de carbono maiores ou menores (PALMER, 1999). Geralmente o uso de altas temperaturas na mostura (67 a 72°C) produz açúcares mais complexos, chamados "dextrinas", que não são fermentadas pelas leveduras, resultando em cervejas mais doces e encorpadas. Em temperaturas mais baixas na mistura (62 a 66°C) as enzimas produzem açúcares básicos, como a maltose, que são fermentados completamente pelas leveduras, resultando em cervejas "secas" ou sem doçura. O tempo típico dessa etapa em pequenas cervejarias é de 90 minutos (ERTHAL, 2006). No processo de mosturação consegue-se a extração de 65% dos sólidos totais do malte (CARVALHO, 2007).

Realizada a mosturação, passa-se à **filtração ou clarificação**, com o objetivo de separar a parte sólida da líquida. Neste contexto, o mosto é filtrado para separar os sólidos não desejáveis (bagaço) do líquido doce. A filtração é extremamente importante para a qualidade da cerveja, visto que os sólidos contêm grande quantidade de proteínas e enzimas coaguladas, resquícios de amido não modificado, material graxo, silicatos e polifenóis. Essas substâncias podem prejudicar as características organolépticas de sabor, odor, viscosidade, assim como o visual da cerveja (REITENBACH, 2010).

Após a separação das partes, a camada filtrante (cascas/bagaço do malte) é lavada com certa quantidade de água (denominada de água secundária) a 78°C. Nesta temperatura a viscosidade do mosto diminui, diluindo os açúcares, que terão mais facilidade para se livrarem dos sólidos do bagaço, diminuindo as perdas; as enzimas estão inativas; o desenvolvimento bacteriano está bloqueado; e não existe risco de extrair substâncias

insolúveis das matérias primas, principalmente taninos da casca do malte. (VENTURINI FILHO, 2000).

Após filtrado passa-se à etapa de **fervura**, que tem duração de 60 a 90 minutos, e é feito para esterilizar e desnaturar as proteínas e enzimas, assim como garantir a qualidade do ponto de vista sensorial e coloidal. Esse processo não pode ser muito longo, pois a reação de escurecimento não enzimático (Reação de Maillard) que intensifica a cor do mosto pode ter efeito negativo, conduzindo à perdas das características de cor e sabor desejáveis. (REITENBACH, 2010).

Durante o processo de fervura é adicionado o lúpulo, para estabilizar o mosto e conferir amargor e aroma à cerveja. Em muitos casos adiciona-se o lúpulo no início e no final da fervura. Quando se deseja ter uma cerveja mais aromática, adiciona-se lúpulo aromático no final da fervura, pois os óleos essenciais são voláteis e evaporam em altas temperaturas (CEREDA, 1983).

Ao término da fervura elimina-se o *trub* (o lúpulo utilizado e os materiais coagulados) por filtragem ou decantação e resfria-se o mosto. A importância da sua eliminação deve-se ao fato de que estes materiais, ao fermentarem, trarão sabores aguados e estranhos à cerveja.

O **resfriamento** do mosto deve ser rápido para evitar a oxidação, contaminação por microrganismos e formação de DMS (Dimetil Sulfeto) (SILVA *et. al.*, 2009). A temperatura final vai depender do tipo de cerveja que será produzida: para cerveja Lager, 7 a 15 °C e para Ale, 18 a 22 °C (SILVA, 2005). Após o resfriamento, o mosto precisa passar pela hidromassagem para a decantação de todas as substâncias sólidas não desejáveis, e conseqüentemente, clarificação e purificação da cerveja. (GAUTO, 2006; CARVALHO, 2007; REITENBACH, 2010).

#### 1.2.2.2 Processo Fermentativo

A fermentação é resultado do metabolismo das leveduras que são capazes de converter açúcares fermentáveis em dióxido de carbono e etanol. Além destes, outros subprodutos metabólicos podem ser gerados durante a fermentação, os quais, juntamente com aqueles

provenientes do malte e do lúpulo serão os responsáveis por formar o *flavour* (aroma e sabor) das cervejas (OLANIRAN *et al.*, 2011; LEI *et al.*, 2012).

As leveduras são responsáveis pela fermentação do mosto. O processo fermentativo para a produção de cerveja é dividido em **fermentação primária e fermentação secundária**. A fermentação primária tem como principal objetivo a produção de etanol e gás carbônico, pela ação das leveduras ao consumir os açúcares fermentescíveis presentes no mosto produzido. Conforme já descrito anteriormente, há dois tipos de fermentação: a fermentação de alta para cervejas *Ale*, e a fermentação de baixa para cervejas *Lager*. As cervejas do tipo *Ale* são produzidas por leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, em temperatura entre 18 e 22 °C, com duração de 3 a 5 dias; as cervejas *Lagers* são produzidas por leveduras *Saccharomyces pastorianus*, em temperatura entre 7 e 15 °C com duração de 7 a 10 dias (SILVA 2005; LIBKIND, *et al.*, 2011).

As estirpes de leveduras cervejeiras são anaeróbios facultativos que podem metabolizar a glicose (e outros açúcares) em condições tanto de anaerobiose como de aerobiose. Durante o crescimento aeróbio tanto a fermentação como a respiração podem contribuir para o catabolismo da glicose, constituindo este, portanto, um metabolismo respiro-fermentativo, o qual é provocado por um efeito conhecido como efeito *Crabtree* ou *repressão metabólica*. Em condições anaeróbias apenas a fermentação é possível. Energeticamente, sendo-lhes mais favorável respirar do que fermentar as leveduras fermentam o menos possível, favorecendo a respiração (Efeito Pasteur). Contudo, nas estirpes cervejeiras, o efeito Pasteur está normalmente ausente (CRUZ, 2007). A principal diferença entre o efeito *Pasteur* e o efeito *Crabtree* é que no primeiro observa-se a tendência da levedura respirar em meios anaeróbios, enquanto no segundo constata-se que a levedura pode fermentar mesmo na presença de oxigênio (NOGUEIRA & VENTURINI FILHO, 2005).

Na fermentação, vários aspectos devem ser considerados para obter uma boa cerveja. Entre eles podemos citar a seleção de uma boa cepa de levedura (deve flocular e decantar no fundo do tanque fermentador ao final do processo); se a cerveja será de baixa ou de alta fermentação; a concentração celular a ser utilizada; os dados de crescimento e morte celular do microrganismo; tempo; e como determinar o término da fermentação (REITENBACH, 2010). A fermentação alcoólica preserva os alimentos, tanto diminuindo o pH, como pela

produção de etanol, condições nas quais poucos microrganismos, além das leveduras, sobrevivem (FERREIRA, 2006).

Ao término da fermentação primária, o resultado é uma cerveja denominada “cerveja verde” a qual precisa passar por outro processo fermentativo, denominado **fermentação secundária ou maturação**. A maturação ocorre em temperatura baixa, entre 0 e 3°C e pode levar semanas ou até mesmo meses, dependendo do tipo de cerveja que esta sendo produzida e se a fermentação foi de alta ou baixa (CEREDA, 1983). Segundo Dragone *et. al.* (2010), a maturação tem como objetivo principal estabilizar o diacetil, composto formado na fermentação primária; iniciar a clarificação da cerveja pela sedimentação de células de leveduras e proteínas; propiciar a carbonatação (quando em baixa temperatura, o gás carbônico é absorvido pela cerveja) e melhorar o odor e sabor da cerveja, pela redução de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico.

#### 1.2.2.3 Acabamento ou Pós-Tratamento

O acabamento ou pós tratamento consiste nas etapas finais de produção da cerveja, sendo estes: filtração, gaseificação e envasamento e pasteurização.

Após a maturação a cerveja é **filtrada**, em alguns casos, para a eliminação de partículas menores em suspensão, se tornando cristalina, brilhante e transparente. A filtração, em tese, não altera a composição e o sabor da cerveja (REITENBACH, 2010).

Adiciona-se como benefício da filtração, o padrão da cerveja dentro da garrafa, pois em alguns casos, principalmente em cervejas caseiras ou artesanais, o líquido na parte inferior é muito mais denso do que na parte superior, e algumas pessoas que não estão acostumadas ligam isso à falta de qualidade. Por outro lado, a não filtração da cerveja acaba deixando as leveduras em suspensão, que são ricas em vitaminas, enriquecendo nutricionalmente a cerveja. Nessa fase são adicionados estabilizantes, antioxidantes, entre outras coisas (REITENBACH, 2010).

A **gaseificação** pode ser feita com injeção de CO<sub>2</sub> forçadamente, ou por *priming* (adição de açúcares fermentescíveis para que a levedura fermente e libere CO<sub>2</sub>). Na indústria geralmente se coloca na cerveja o CO<sub>2</sub> que foi reservado da fase de fermentação, ou se faz

uma técnica parecida com a do *priming*, porém sem adição de açúcar. A técnica parecida com a do *priming* é um sistema que permite manter a cerveja sob pressão de CO<sub>2</sub> no tanque de maturação. Assim, a cerveja não perde todo o gás que trouxe da fermentação e permite acumular mais um pouco produzido no próprio maturador. Se depois disso a cerveja não estiver com a pressão adequada para o envase, é adicionado CO<sub>2</sub> forçadamente. Há empresas que injetam gás de qualquer forma, sem se preocupar se terá como a própria cerveja produzir o gás ou não, e só depois mantêm-nas nos tanques pressurizados até a carbonatação. Existem cervejarias, ainda, que eventualmente injetam gás nitrogênio, com o intuito de favorecer características de formação de espuma (SANTOS & RIBEIRO, 2005).

Para produções de caráter artesanal é feito o *priming*, que consiste na adição de açúcar na cerveja não filtrada, e imediato envasamento. Esse açúcar adicionado deve ser o de mais fácil uso da levedura, por isso ele passa pelo processo de inversão (é fervido por algum tempo para que a sacarose se transforme em glicose + frutose, e em baixo pH para que não haja caramelização). As leveduras da cerveja irão fermentar esse açúcar, e produzir CO<sub>2</sub>, e por estar fechada, a garrafa vai pressurizar, e o gás carbônico irá se armazenar no líquido.

O **envasamento** pode ser feito junto com o *priming*, e o principal cuidado nesse momento diz respeito à esterilização das garrafas. Em casa, elas podem ser lavadas com solução de iodo, água a 100°C em abundância, entre outras coisas. Na indústria se faz uso de várias soluções, como a de hidróxido de sódio. Em laboratório é possível autoclavar as garrafas. Caso isso não seja feito, a chance de contaminação da cerveja é muito grande, colocando tudo a perder justo no momento onde já foi gasto a maior quantidade de tempo e dinheiro para o desenvolvimento do produto (PALMER, 1999).

A **pasteurização** é uma etapa optativa, sendo que a diferença do chope (ou cerveja viva) para a cerveja, é que a cerveja é pasteurizada, e o chope não. Normalmente, para cervejas artesanais ou caseiras, não é feita a pasteurização, pois se deseja manter o gosto original da cerveja, bem como as leveduras vivas para serem degustadas. De acordo com Carvalho (2007), a pasteurização pode ser realizada por dois processos, que acontecem em tempos diferentes:

- ✓ Antes do envasamento: quando o líquido passa por placas do trocador de calor, e permanece por alguns segundos por 75°C. Nesse processo a cerveja perde muito gás CO<sub>2</sub>, que deve ser repostado.
- ✓ Após o envasamento, ou em túnel: consiste em passar as latas ou garrafas de cervejas por um túnel onde é borrifado vapor d'água no produto, fazendo-o aquecer até 70°C, e depois é borrifado água fria, fazendo o produto voltar à uma temperatura segura.

### 1.2.3 O SELÊNIO

O selênio foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons Jacobs Berzélius, quando analisava um depósito vermelho na parede de câmaras de chumbo usadas na produção de ácido sulfúrico. É classificado como um metaloide situado entre o enxofre e o telúrio no grupo VI A e entre o arsênio e o bromo no 4º Período da Tabela Periódica (TINGGI, 2003).

O selênio é um mineral que desempenha funções antioxidantes, sendo um nutriente essencial para os animais e seres humanos. Pode encontrar-se em quatro estados de oxidação, tais como selênio elementar (Se<sup>0</sup>), seleneto (Se<sup>2-</sup>), selenito (Se<sup>(+4)</sup>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e selenato (Se<sup>(+6)</sup>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) e em duas formas químicas como sais minerais inorgânicos (selenito de sódio, selenato) e orgânicos (selenometionina, selenocisteína) (STOLZ *et al.*, 2006).

O mineral é amplamente distribuído em toda a crosta terrestre, entretanto, a quantidade é bastante variável e, por consequência, os solos apresentam conteúdos de selênio que podem variar de quantidades traço até níveis tóxicos, como os solos seleníferos da Irlanda que atingem concentrações de selênio de 1250 mg kg<sup>-1</sup> (ALISSA *et al.*, 2003; HARTIKAINEN, 2005).

Alimentos como a castanha-do-pará e o rim bovino são considerados as melhores fontes de selênio. Carne bovina, frango, peixe e ovos, além de serem ricos em proteínas, também apresentam quantidades importantes de selênio e em muitos países são a principal fonte alimentar do mineral. Leite e derivados, dependendo da espécie animal e do conteúdo de gordura, também podem fornecer boas quantidades do mineral, sendo que o leite de vaca e aqueles com maior quantidade de gordura apresentam as menores concentrações. Frutas e verduras, em geral, são pobres em selênio, com exceção dos vegetais denominados

“acumuladores” de selênio, como alho, mostarda indiana, brócolis, couve-de-bruxelas, couve rábano, couve-flor, repolho, cebola e alguns cogumelos, os quais podem fornecer quantidades importantes do mineral quando consumidos adequadamente. O lêvedo de cerveja também pode ser classificado como fonte de selênio. Em regiões com solos que apresentam quantidade suficiente de selênio, o trigo é uma boa fonte do mineral, e, por consequência, o consumo de pães e cereais pode contribuir com a ingestão do mineral (ALISSA *et. al.*, 2003; NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008; RAYMAN, 2000).

#### 1.2.3.1 O Selênio e a Saúde Humana: Essencialidade *versus* Toxicidade

A importância do selênio (Se) como elemento traço essencial para a saúde humana (PEDRERO & MADRID, 2009) é reconhecida e a sua deficiência está diretamente correlacionada à ocorrência de várias doenças (BOOSALIS, 2008; LU & HOLMGREN, 2009; RAYMAN, 2000; LATRECHE & CHAVATTE, 2008).

Em várias regiões do mundo o teor de selênio na dieta foi estimado como sendo insuficiente para a correta atividade de proteção das selenoenzimas. Os primeiros relatos de doenças devido à deficiência de selênio na população humana ocorreram na China (TINGGI, 2003). A deficiência em selênio diminui a quantidade de selenoproteínas, alterando os processos biológicos mediados por estas, e impede a síntese e a função da GPX (glutathione-peroxidase). Os efeitos da deficiência de selênio são geralmente a cardiomiopatia reversível, conhecida como a doença de Keshan, infertilidade e artrite (PEDRERO & MADRID, 2009).

A dose diária recomendada (DDR) de selênio para homens e mulheres é de cerca de 55µg.dia, muito embora este valor dependa do país, região, idade e sexo dos indivíduos (PEDRERO & MADRID, 2009). O nível máximo de ingestão de selênio é cerca de 400µg.dia. A ingestão elevada de selênio pode causar toxicidade provocando selenose (anormalidades neurológicas, mancha esbranquiçada nas unhas) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2000).

O selênio pode ter um efeito antioxidante e pró-oxidante quando em excesso, dependendo da espécie, do estado de oxidação e da concentração. Os efeitos benéficos parecem estar associados à redução dos danos oxidativos causados pela excessiva quantidade

de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BERGER, 2005; PEDRERO & MADRID, 2009). O selênio na forma de selenocisteína (constituente do centro ativo da enzima glutationa-peroxidase que é responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio) desempenha um papel importante no sistema imunológico, reduzindo a presença de ROS contribuindo para a diminuição do desenvolvimento de doenças crônicas, como o cancro e doenças cardíacas. A toxicidade do selênio pode levar à formação de ROS, as quais podem induzir à oxidação do DNA, à quebra da sua cadeia dupla e a morte celular (PÉREZ-CORONA *et al.*, 2011; NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008).

#### 1.2.3.2 Suplementação do Selênio por Leveduras

A partir do conhecimento das propriedades antioxidantes e preventivas do selênio contra o cancro, além de estudos “*in vitro*” demonstrarem ser um importante inibidor da replicação do vírus HIV, bem como melhorar a resposta imunológica a doenças relacionadas com este vírus como a herpes e cândida, há um grande interesse em desenvolver suplementos nutricionais enriquecidos com selênio (RAYMAN, 2012; NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008; PONCE DE LEÓN *et al.*, 2002).

A levedura *S. cerevisiae* tem a capacidade de transformar o selênio inorgânico em compostos orgânicos e, dependendo das condições de crescimento, pode acumular elevadas quantidades de selênio (até 3000 mg kg<sup>-1</sup>) e transformá-lo em selenometionina (PEDRERO & MADRID, 2009; PÉREZ-CORONA *et al.*, 2011).

A produção de leveduras selenizadas é relativamente econômica e consegue-se mediante o enriquecimento com selenito de sódio, entretanto seu uso não se restringe à preparação de suplementos. Na região norte da Ucrânia, utiliza-se como fermento para a elaboração de pão. O teor de selênio neste pão é equivalente a 25 % do DDR e é encontrado principalmente na forma de selenometionina (PEDRERO & MADRID, 2009).

A partir destas abordagens, Pérez-Corona *et al.* (2011) avaliaram em escala laboratorial pela primeira vez a transformação do selenito pelas leveduras da espécie *S. cerevisiae* e *S. bayanus* durante a produção de vinho branco, concluindo que a produção de vinho branco por fermentação alcoólica é compatível com a presença de selênio inorgânico e

independente da espécie utilizada, e que o vinho com selênio pode ser uma fonte adequada de selenometionina. Também em escala laboratorial, Martinez *et. al.* (2012) avaliaram a biotransformação de selenito por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum* em fermentações para produção de cerveja *Ale* e *Lager*, respectivamente, concluindo que processo de fermentação alcoólica não foi afetado pela presença de selênio, independentemente do tipo de levedura, e que a selenometionina foi o principal composto de selênio encontrado nas leveduras e nas cervejas.

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISSA, E. M.; BAHJRI, S. M.; FERNS, G. A. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Med Sci Monit.*, v. 9, n. 1, p. RA9-18, Jan 2003.

ANDRIETTA, S. R.; MIGLIARI, P. C.; ANDRIETTA, M. G. S. *Classificação das cepas de levedura de processos industriais de fermentação alcoólica utilizando capacidade fermentativa*. STAB: Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 17, n. 5, p. 54-59, 1999.

BARUSELLI, M.S. Suplementos e co-produtos na nutrição de gado de corte. In: I SIMBOI - Simpósio sobre desafios e novas tecnologias na bovinocultura de corte. *Anais*. Brasília-DF: 2005.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeasts. *Food Technology Biotechnology*, v.44, n.3, p.407-415, 2006.

BENITEZ, J. L.; FORSTER, A.; DE KEUKELEIRE, D.; MOIR, M.; SHARPE, F. R.; VERHAGEN, L. C.; WESTWOOD, K. T. Hops and Hop Products. In: *EBC Technology and Engineering Forum*, 1997, Getranke-Fachverlag, Germany.

BERGER, M. M. Can oxidative damage be treated nutritionally? *Clinical Nutrition*. v. 24, n. 2, p. 172-183. Abr 2005.

BOOSALIS, M. G. The role of selenium in chronic disease. *Nutr. Clin. Pract.* 23 (2008) 152.

BRASIL. 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Decreto Nº 6871, de 04 de junho de 2009*. Diário Oficial da União, Brasília 05/06/2009. Disponível em: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 07/11/2013.

BRIGGS, D. E.; BOLTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. *Brewing: Science and Practice*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2ª parte – A Fermentação. *Revista Analytica*, nº26, p. 46-54, dez 2006/jan 2007.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª parte – As Leveduras. *Revista Analytica*, São Paulo, nº25, p. 36-42, 2006.

CARVALHO, L. G. Dossiê Técnico. *Produção de cerveja*. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.respostatecnica.org.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTc=>>. Acesso em: 07/11/2013.

CEREDA, M. P. Cervejas. In: AQUARONE *et al.* *Biotecnologia alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. Sao Paulo: Edgar Blucher, 1983. Cap. 3, p. 46.

CERVBRASIL. 2016. Anuário 2015 da Associação Brasileira da Indústria da cerveja. Disponível em: <<http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=anuario-2015>>. Acesso em: 03 de Fevereiro de 2016.

CRUZ, J. M. M. Cerveja. In: FONSECA, M. M.; TEIXEIRA, J. A. *Reactores Biológicos*. Lisboa/Porto: Lidel, 2007. p. 277-305.

CURI, R. A. *Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte*. 2006. xi, 123 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/101727>>. Acessado em 15 de setembro de 2015.

DERMICI, A.; POMETTO III, A. Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. *Journal of Agricultura Food Chemistry*, v.47, p. 2491-2495, 1999.

DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, JB. Cerveja. In: Venturini Filho, G. W. *Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia*, pp.15-50. Edgar Blucher Ltda. 1ª edição. Vol.1. Brasil, 2010.

EDWARD, M. *Production of Wine, Beer, Spirits and Liqueurs*. Global Media, 2009.

EFSA. European Food Safety Authority. *Selenium-enriched yeast as source for selenium added for nutritional purposes in foods for particular nutritional uses and foods (including food supplements) for the general population*. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food. 766, 1-42, 2008.

ERTHAL A. D. *Microcervejaria*. SEBRAE, 2006. Disponível em: <<http://www.sebraesc.com.br/ideais/default.asp?vcdtexto=2179&^^>>. Acessado em: 10 de Novembro de 2015.

FERREIRA, J.C. LFBM, Aula I Prof. Júlio C. Ferreira. *Disciplina de Vegetais Inferiores*. 2006. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/7058998/Leveduras-I>>. Acessado em: 20 de maio de 2015.

GAUTO, M. A.; Curso Técnico em Química. *Processos Industriais*. 2006. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/46483227/Processos-Industriais-Cerveja>>. Acessado em: 05 de Abril de 2015.

GONZALEZ, S. B. E.; QUEIROL, A. Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriazevii* in brewing. *Applied Environmental and Microbiology*. 74: 2314-2320. 2008.

GUIMARÃES, T. M. *Isolamento, identificação e seleção de cepas de levedura Saccharomyces cerevisiae para elaboração de vinho*. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPA. Curitiba, 2005.

HARTIKAINEN, H. Biogeochemistry of selenium and its impact on food chain quality and human health. *J Trace Elem Med Biol.*, v. 18, n. 4, p. 309-318, 2005.

ICB – INSTITUTO DA CERVEJA BRASIL. 2016. *Um retrato da cerveja artesanal no Brasil*. Disponível em: <<http://revistabeerart.com/news/numeros-do-mercado-da-cerveja-artesanal>>. Acesso em: 22 de Dezembro de 2016.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Academies Press. *Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids*. Washington: National Academy Press, 2000.

KALNIN, J. L. *Avaliação Estratégica para Implantação de Pequenas Cervejarias*. Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Produção e Sistemas, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, novembro de 1999. Disponível em: <<http://www.homebrewer.com.br/brewpub/Estrategica-MicroCervejaria.pdf>>. Acesso em: 07/11/2013.

LATRECHE, L.; CHAVATTE, L. Selenium incorporation into selenoproteins, implications in human health. *Met. Ions Biol. Med.* 10 (2008) 731.

LEI, H.; ZAO, H.; YU, Z.; ZAO, M. (2012). Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166: 1562–1574.

LIBKIND, D.; HITTINGER, C.; VALERIO, E.; GONÇALVES, C.; DOVER, J.; JOHNSTON, M.; GONÇALVES, P.; SAMPAIO, J. From the Cover: Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108: 14539-14544. 2011.

LU, I; HOLMGREN, A. Selenoproteins. *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 723.

MARTÍNEZ, M. S.; SILVA, E. P. G.; PÉREZ-CORONA, T.; CÁMARA, C.; FERREIRA, S. L. C.; MADRID, Y. Selenite biotransformation during brewing: Evaluation by HPLC–ICP–MS. *Talanta*. v. 88 p. 272–276. 2012.

MARTINS, S. M. *Como fabricar cerveja*. 2. ed. São Paulo: Icone, 1991.

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

NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ.*, v. 400, n. 1-3, p. 115-141, Aug 2008.

NOGUEIRA, A. M. P.; VENTURINI FILHO, W. G. *Aguardente de Cana*. Universidade Estadual Paulista - UNESP (Faculdade de Ciências Agrônomicas-Botucatu/SP), Livro, Abril, 2005.

OETTERER, M.; ALCARDE, A. R. (2006) Tecnologia da Fabricação de Cerveja. In: OETTERER, M., REGITANO, M. A. B., SPOTO, M. H. F. *Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Editora Manole Ltda. São Paulo.

OLANIRAN, A.O.; MAHARAJ, Y.R.; PILLAY, B. (2011). Effects of fermentation temperature on the composition of beer volatile compounds, organoleptic quality and spent yeast density. *Electronic Journal of Biotechnology* [on line]. 14.

PALMER, J. *How to Brew*. 1999. Disponível em: <[http://howtobrew.homebrewer.com.br/index.php/P%C3%A1gina\\_principal](http://howtobrew.homebrewer.com.br/index.php/P%C3%A1gina_principal)>. Acesso em: 05/11/2013.

PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 634 p. 135–152, 2009.

PÉREZ-CORONA, M.T.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M.; VALDERRAMA, M.J.; RODRÍGUEZ, M.E.; CÁMARA, C.; MADRID, Y. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments. *Food Chemistry*, v. 124, n. 3. p. 1050-1055. Feb 2011.

PONCE DE LEÓN, C. A.; BAYON, M. M.; PAQUIN, C; CARUSO, J. A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. *J Appl Microbiol* 92(4):602-10. 2002.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. *The Lancet*. v. 379, p. 1256-1268. Apr, 2012.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. *The Lancet*. v. 356, n. 9225, p. 233-241, Jul 2000.

REINOLD, M. R. *Elaboração do mosto: Curso intensivo para cervejeiros práticos*. 1990.

REITENBACH, A. F. *Desenvolvimento de cerveja funcional com adição de probiótico: Saccharomyces boulardii*. Não paginado. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2010.

SANTOS, M. S. dos; RIBEIRO, F. de M. *Cervejas e refrigerantes*. São Paulo: CETESB, 2005. 58p. Disponível em: < [http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas\\_refrigerantes.pdf](http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf)>. Acessado em: 20 de maio de 2015.

SCHRAUZER, G. N. Selenium yeast: Composition, quality, analysis, and safety. *Pure and Applied Chemistry*. IUPAC v. 78, n. 1, p. 105–109, 2006.

SILVA D. P. *Produção e Avaliação Sensorial de Cerveja Obtida a Partir de Mostos com Elevadas Concentrações de Açúcares*. 2005. 177p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, 2005.

SILVA, A. E.; COLPO, E.; OLIVEIRA, V. R.; JUNIOR HERBST, C.G.; HECKTHEUER, L. H. R.; REICHERT, F. S. Elaboração de cerveja com diferentes teores alcoólicos através de processos artesanais. *Alimentos e Nutrição*. Araraquara. V.20, n.3, p.369-374, jul./set. 2009.

STEWART, G. G. Adjuncts. In: HARDWICK, W. A. *Handbook of Brewing*. New York: Marcel Dekker, 1994. p.121-132.

STOLZ, J. F.; BASU, P; SANTINI, J. M.; OREMLAND, R. S. Arsenic and Selenium in Microbial Metabolism. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 60: 107-130. 2006.

SUHAJDA, A.; HEGOCZKI, J.; JANZSO, B.; PAIS, I.; VERECZKEY, G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v.14, p.43-47, 2000.

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*. 137 p. 2003.

TSCHOPE, E. C. *Microcervarias e Cervarias. A História, a Arte e a Tecnologia*. São Paulo: Editora Aden, 2001. 223p.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. *Beverages technology Chemistry and microbiology*. London: Chapman &Hall. 1994, 464p.

VAUGHAN-MARTINI, A.; MARTINI, A. A taxonomic key for the genus *Saccharomyces*. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 16, n. 1, p. 113-119, 1993.

VENTURINI, W. G. F.; CEREDA, M. P. W. Cerveja. In: *Biotecnologia Industrial-Biotecnologia na produção de alimentos*. V. 4, São Paulo: Edgard Blucher, 2008. Cap. 4, p. 91-144.

VENTURINI FILHO, W. G. *Tecnologia de Bebidas*. 1 ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda. 2005.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. Volume 4. Biotecnologia na Produção de Alimentos. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. p.91-144.

VENTURINI FILHO, W. G. *Tecnologia de cerveja*. Jaboticabal: Funep, 2000.

YOUNIS, O. S.; STEWART, G. G. Effect of malt wort, very high gravity malt wort, and very high gravity adjunct wort on volatile production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of the Brewing Chemists*, v. 57, n. 2, p. 39-45, 1999.

## **CAPÍTULO 2**

### **APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL CERVEJEIRO**

# APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE ANÁLISE MULTIVARIADA PARA SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL CERVEJEIRO

## RESUMO

A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, produzida a partir de água, malte e lúpulo, fermentada e carbonatada por ação de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*. As leveduras são tão importantes que definem o tipo de cerveja a ser produzida (*Ale* ou *Lager*) e assim como para o malte e o lúpulo, as pesquisas no Brasil ainda são incipientes, sendo necessário a sua importação. Várias são as características que definem o potencial de uma levedura para produção de cerveja, as quais são avaliadas a partir da realização de diversas análises ao longo do processo fermentativo. As técnicas estatísticas de análise multivariada podem auxiliar na tabulação e análise exploratória dos dados obtidos, possibilitando o reconhecimento de padrões. Esta pesquisa objetivou utilizar metodologias de análise multivariada para selecionar leveduras com potencial para produção de cerveja. Foram avaliadas 10 cepas de leveduras, isolados dos biomas Mata Atlântica e Caatinga da Bahia – Brasil, em fermentação conduzida em mosto puro malte de cevada a 12 °P, sendo realizadas análises de: extrato aparente, produção de etanol, grau aparente de fermentação, consumo de maltose e maltotriose e produção de glicerol. Análise de Componentes Principais, Análise de Agrupamentos Hierárquicos e Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen foram utilizados para a seleção das leveduras. As leveduras comerciais S-23 (*Lager*) e S-04 (*Ale*), fabricante *Fermentis*, foram utilizadas como parâmetro de controle. As cepas SC52, SC57 e SC82 foram selecionadas como potenciais para produção de cerveja, apresentando rendimentos fermentativos superiores às leveduras comerciais. Os resultados analisados por meio de comparação das médias das análises realizadas ao longo do processo fermentativo foram idênticos aos obtidos por meio das técnicas de análise multivariada utilizadas, evidenciando que as metodologias podem ser utilizadas em trabalhos de seleção de leveduras para produção de cervejas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Análise multivariada; *Saccharomyces cerevisiae*; Cerveja

## APPLICATION OF MULTIVARIATE ANALYSIS TECHNIQUES FOR SELECTION OF YEAST WITH POTENTIAL BREWER

### ABSTRACT

Beer is the most consumed alcoholic beverage in the world, produced from water, malt and hops, fermented and carbonated by yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Yeasts are so important that they define the type of beer to be produced (Ale or Lager) and as for malt and hops, research in Brazil is still incipient, and its importation is necessary. There are several characteristics that define the potential of a yeast for brewing, which are evaluated from several analyzes throughout the fermentation process. The statistical techniques of multivariate analysis can aid in the tabulation and exploratory analysis of the obtained data, allowing the recognition of patterns. This research aimed to use multivariate analysis methodologies to select yeasts with brewing potential. Ten strains of yeast isolated from the Atlantic Forest and Caatinga biomes of Bahia - Brazil were evaluated in a fermentation conducted in pure malt barley at 12 °P, and analyzed for: apparent extract, ethanol production, apparent degree of fermentation, Consumption of maltose and maltotriose and production of glycerol. Principal Component Analysis, Hierarchical Clusters Analysis and Kohonen's Self-Organizing Maps were used for the selection of yeasts. Commercial yeasts S-23 (Lager) and S-04 (Ale), manufacturer Fermentis, were used as control parameters. The strains SC52, SC57 and SC82 were selected as potentials for beer production, presenting higher fermentative yields than commercial yeasts. The results analyzed by means of a comparison of the means of the analyzes carried out along the fermentation process were identical to those obtained through the multivariate analysis techniques used, evidencing that the methodologies can be used in yeast selection works to produce beers.

**KEY WORDS:** Multivariate analysis; *Saccharomyces cerevisiae*; Beer

## 2.1 INTRODUÇÃO

Muitas são as espécies de leveduras empregadas em processos biotecnológicos sendo que a principal é a *Saccharomyces cerevisiae* devido a sua fisiologia fermentativa única (JOHNSON & ECHAVARRI-ERASUN, 2011). É uma espécie de levedura amplamente estudada dada a sua relevância para as indústrias de alimentos e bebidas, medicina e agricultura.

As leveduras são cultivadas visando à obtenção de biomassa (para indústrias de fermentos biológicos), derivados de componentes celulares (como nas indústrias farmacêuticas e de suplementos alimentares) e a produção de compostos (como o etanol) (TORTORA *et. al.*, 2002). Para cervejas, além de produzir etanol e CO<sub>2</sub>, são responsáveis por conferir sabor, aroma e textura.. É o organismo biológico que transforma o mosto cervejeiro em produto final. São tão importantes que definem o tipo de cerveja que será produzida, classificando-as em *Ale* ou *Lager*, a depender do tipo de cepa utilizada. Entretanto a maioria deste material não é produzido no Brasil, o que resulta num custo elevado de aquisição (CEREDA, 1983; SILVA, 2005; CARVALHO *et. al.*, 2006 e DRAGONE & ALMEIDA E SILVA, 2010).

A cerveja pode ser definida como uma bebida produzida a partir de água, malte e lúpulo, fermentada e carbonatada por ação de leveduras. As etapas de produção de cerveja (Figura 2.1) variam em função do estilo a ser produzido, entretanto de uma forma geral o processo envolve quatro fases: (1) maltagem (com base na germinação de cevada); (2) produção de mosto (maceração, isto é, a extração e a hidrólise dos componentes do malte e, possivelmente, outros cereais, seguindo-se a separação dos componentes não solúveis e ebulição com lúpulo ou extratos de lúpulo); (3) de fermentação (na maioria dos casos, divididos em fermentação primária ou principal e fermentação secundária); e (4) acabamento (filtração, estabilização, engarrafamento, etc.) (LINKO, *et. al.*, 1998).

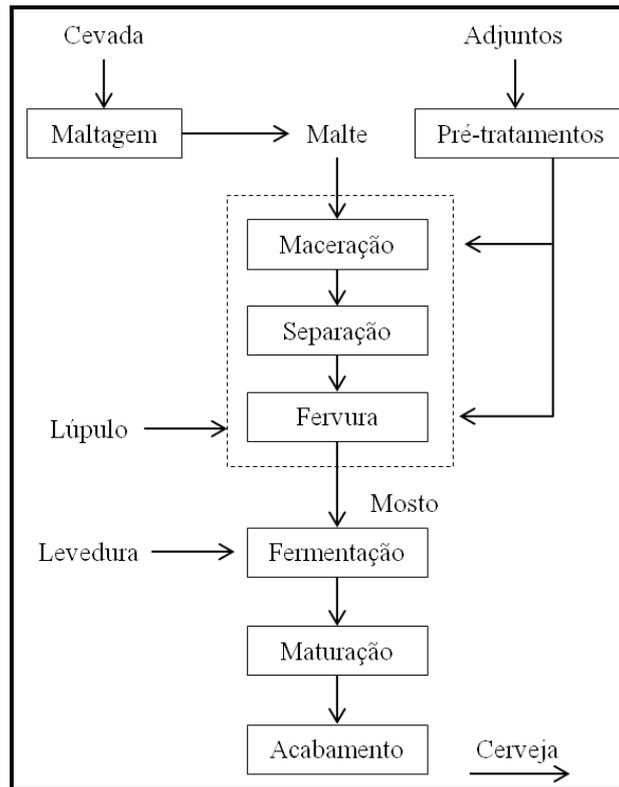


Figura 2.1 – Processo simplificado de fabricação de cerveja. Adaptado de LINKO, *et. al.* (1998).

À exceção da água, as demais matérias primas utilizadas para a produção de cervejas no Brasil são em sua grande maioria importadas, existindo poucos estudos e pequenas áreas cultivadas de cevada e de lúpulo. No que diz respeito às leveduras utilizadas no processo, os estudos ainda são incipientes, sem registros na literatura.

Considerando a grande biodiversidade brasileira alguns centros de pesquisa já possuem a sua coleção de cepas, isoladas dos mais diversos biomas à exemplo do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e do Laboratório de Microbiologia Aplicada da Agroindústria (LABMA) da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), localizados no Estado da Bahia-Brasil, nas cidades de Feira de Santana e Ilhéus, respectivamente.

Leveduras consideradas boas produtoras de cerveja apresentam as seguintes características: velocidade rápida de fermentação, sem crescimento celular excessivo; utilização eficiente da maltose e maltotriose; habilidade de tolerar o estresse imposto pelas altas concentrações de álcool e pressões osmóticas do mosto (PRIEST & CAMPBELL, 1996). Tais características são observadas partir da realização de análises e consequentemente

avaliação dos dados gerados ao longo do processo fermentativo. O tratamento e a percepção do que estes dados representam são importantes para avaliação da capacidade produtiva da levedura em estudo.

Atualmente existem diversas técnicas disponíveis para manipulação e tratamento de dados, possibilitando o destaque de algumas informações ou que inteligentemente reconhecem padrões existentes e potencialmente relevantes. Dentre estas, estão a Análise de Componentes Principais (ACP); Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH) e os Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen (*Self Organizing Maps – SOM*), uma técnica de Redes Neurais Artificiais de análise exploratória e reconhecimento de padrões (FERNANDES, 2010).

Diante deste cenário e considerando que a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida do mundo, bem como observando o crescente movimento de produção de cerveja artesanal no Brasil, este trabalho objetiva utilizar técnicas multivariadas como estratégia de análise exploratória para selecionar leveduras para produção de cerveja artesanal.

## **2.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.2.1 LEVEDURAS CERVEJEIRAS**

As leveduras utilizadas na produção da cerveja pertencem ao gênero *Saccharomyces* e estão distribuídas na espécie *S. cerevisiae*, sendo responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, metabolizando os açúcares fermentescíveis para produzir álcool, gás carbônico, energia na forma de ATP e calor (CURI, 2015). As características de sabor e aroma de qualquer cerveja são determinadas, principalmente, pelo tipo de levedura utilizada.

As cervejas são classificadas em função do tipo de levedura utilizada, em *Ale* ou *Lager*. Leveduras *Ale* são predominantemente classificadas como *S. cerevisiae*, embora algumas cepas sejam, na verdade, híbridos entre *S. cerevisiae* e *S. kudriavzevii* (GONZALEZ, *et. al.*, 2008). São consideradas leveduras de alta fermentação, pois fermentam com temperaturas entre 18 e 22°C. No final da fermentação (3 a 5 dias), as células se elevam à superfície do líquido formando uma película flutuante e espessa de biomassa que podem ser retiradas desta superfície; são muito populares na Grã Bretanha.

As leveduras *Lager* são da espécie *S. pastorianus*, uma espécie domesticada, proveniente da fusão entre os genomas das espécies *S. cerevisiae* e *S. eubayanus*, gerando um híbrido tetraploide. Portanto, *S. pastorianus* trata-se de uma espécie exclusiva do meio produtivo, e ausente naturalmente no ambiente (LIBKIND, *et. al.*, 2011). São consideradas leveduras de baixa fermentação, em função de fermentarem em temperatura que varia entre 7 e 15°C, floculando ao final da fermentação (7 a 10 dias), sendo coletadas na base do fermentador; são mais populares mundialmente.

Embora exista esta diferenciação tecnológica no setor de cervejarias, para efeito de denominação como levedura cervejeira os taxonomistas têm designado que todas as leveduras empregadas na produção de cerveja pertencem à espécie *S. cerevisiae* (CARVALHO, *et. al.*, 2006; VENTURINNI FILHO & CEREDA, 2001).

Além das leveduras citadas, para diferentes estilos de cerveja, têm-se cepas específicas para propiciar a fermentação. Como exemplos, temos as cervejas Lambics em que utiliza-se *Bretanomyces*, uma cepa de levedura selvagem que em conjunto com uma bactéria láctica fermentam a cerveja; e a cerveja Bavarian weissbier (cerveja de trigo), em que emprega-se a levedura *Torulaspora deubruueckii* (BRIGGS, *et. al.*, 2004).

## 2.2.2 ANÁLISE MULTIVARIADA

Com o desenvolvimento da tecnologia computacional e de software as empresas atualmente tem conseguido armazenar com bastante eficiência dados do seu sistema produtivo. Entretanto, avaliar estes dados tornou-se impossível para a capacidade humana, resultando no surgimento de técnicas capazes de processá-los e realizar análise exploratória e reconhecimento de padrões, à exemplo das técnicas de Análise de Componentes Principais (ACP), Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH) e Redes Neurais Artificiais (RNA).

### **2.2.2.1 Análise de Componentes Principais (ACP)**

A análise de componentes principais é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão denominadas de componentes principais.

A ACP pode ser definida como um método matemático que emprega a transformação ortogonal para converter um conjunto de variáveis possivelmente correlacionadas a um conjunto de valores de variáveis linearmente descorrelacionadas chamadas componentes principais (MORAIS, 2011).

### **2.2.2.2 Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA)**

A Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) consiste no tratamento matemático de cada amostra como um ponto no espaço multidimensional descrito pelas variáveis escolhidas. A HCA interliga as amostras por suas associações, produzindo um dendograma onde as amostras semelhantes, segundo as variáveis escolhidas, são agrupadas entre si, tendo como suposição básica de interpretação que quanto menor a distância entre os pontos, maior a semelhança entre as amostras. O dendograma hierarquiza esta similaridade de modo que podemos ter uma visão bidimensional da similaridade ou dissimilaridade de todo o conjunto de amostras utilizado no estudo. Quando o dendograma construído é das variáveis, a similaridade entre duas variáveis aponta forte correlação entre estas variáveis do conjunto de dados estudado. Os dendogramas de amostras são mais comuns (MOITA NETO & MOITA, 1998).

### **2.2.2.3 Redes Neurais Artificiais - RNA**

As Redes Neurais Artificiais (RNA) constituem técnicas de reconhecimento de padrões que têm sido amplamente utilizadas nos últimos anos devido a possibilitar o desenvolvimento de algoritmos de resolução de problemas que viabilizam o mapeamento, modelagem e classificação de dados (MARINI, 2009; ZUPAN, *et. al.*, 1994). As RNAs têm sido aplicadas a diversos processos de controle de qualidade em alimentos (DU & SUN, 2005; CIOSEK, *et. al.*, 2005; MARINI, *et. al.*, 2003) e bebidas (BELTRÁN, *et. al.*, 2006;

RAPTIS, *et. al.*, 2000; KRUZLICOVA, *et. al.*, 2009; PENZA & CASSANO, 2004; RAGAZZO-SANCHEZ, *et. al.*, 2008; ALONSO-SALCES, *et. al.*, 2005; JACK & STEELE, 2002), incluindo cervejas (CIOSEK & WRÓBLEWSKI, 2006; CIOSEK, *et. al.*, 2006; SILVA, *et. al.*, 2008; ALCAZÁR, *et. al.*, 2002).

É uma metodologia fundamentada originalmente na tentativa de modelar a rede de neurônios humanos para a compreensão do funcionamento do cérebro. A motivação inicial foi a de realizar tarefas complexas que o cérebro é capaz de executar através da simulação de seu funcionamento.

Um modelo inicial de neurônio (unidade básica da RNA) como uma unidade de processamento binária constituiu a primeira proposição de funcionamento em forma de rede e mostraram que estas unidades eram capazes de executar várias operações lógicas (ZANINI, 2004).

O conceito empregado atualmente é definido como um processador capaz de extrair conhecimento experimental e disponibilizá-lo para utilização na prática em modelos de previsão e métodos de classificação. As RNAs extraem o conhecimento através do aprendizado e treinamento, a informação é armazenada em pesos e cada neurônio possui uma função de ativação (geralmente não-linear) que utiliza os padrões de entrada ponderados para definir a saída. Logo, o processo de aprendizado de uma rede ocorre utilizando um algoritmo que deve ser capaz de ajustar iterativamente os pesos para alcançar o objetivo proposto. A etapa de aprendizado da rede depende do algoritmo de aprendizagem do processo iterativo de alteração dos pesos de conexão, na qual os neurônios de uma RNA estão estruturados (interconectados). Existem diferentes algoritmos de aprendizagem para RNAs, destacando-se dois grandes grupos: (1) Métodos de aprendizagem supervisionados e (2) Métodos de aprendizagem não-supervisionados. No primeiro, a rede neural recebe um conjunto de entradas e seus correspondentes padrões de saída, onde ocorrem ajustes nos pesos sinápticos até que o erro entre os padrões de saída gerados pela rede tenha um valor desejado, no outro, a rede neural trabalha os dados de forma a determinar algumas propriedades similares entre os padrões de entrada. A partir destas propriedades é que o aprendizado é constituído (KANGAS, *et. al.*, 1990).

Considerando que para a seleção das leveduras em estudo foram realizadas comparações entre os dados fermentativos obtidos ao longo do processo com leveduras controle (leveduras comerciais), portanto avaliando similaridades entre estas, nesta pesquisa optou-se pelo uso de método não-supervisionado, sendo utilizada a técnica dos Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen (SOM).

#### 2.2.2.3.1 Mapa Auto-Organizável de Kohonen (SOM)

Mapa Auto-Organizável de Kohonen (SOM - Self-Organizing Maps) é um método não supervisionado com uma estratégia de aprendizagem competitiva, com uma função de interação de vizinhança. É uma técnica de agrupamento de dados bastante utilizada que fornece uma representação visual dos dados através do posicionamento espacial dos representantes desses grupos. O mapa de visualização desvenda, assim, uma estrutura topológica escondida nos dados (KANGAS, *et. al.*, 1990). Sua arquitetura é composta somente por duas camadas, sendo caracterizadas pela formação de um mapa topográfico dos padrões de entrada que revelam suas características (KOHONEN *et. al.*, 1996).

O agrupamento é realizado através da aprendizagem não supervisionada, em que os clusters (classes) são formados explorando as semelhanças ou dissimilaridades entre os padrões de entrada com base em suas inter-correlações (Figura 2.2). A rede atribui padrões "semelhantes" ao mesmo cluster. Exemplos de aplicações da microbiologia incluem a discriminação de subespécies utilizando a espectrometria de massa por pirólise e as redes de Kohonen (GOODACRE *et. al.*, 1994).

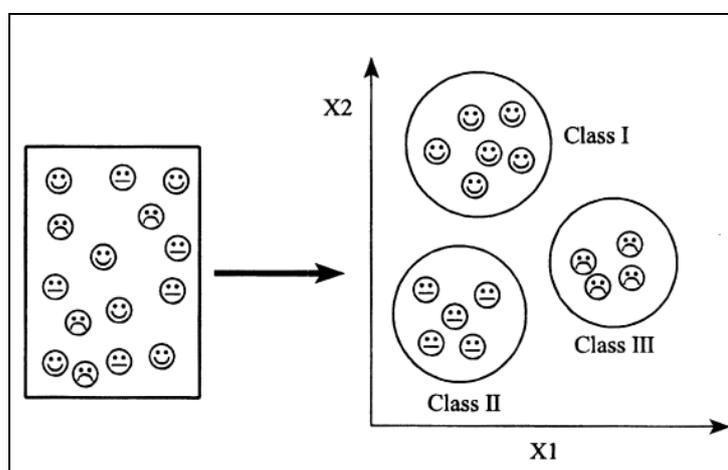


Figura 2.2 – Exemplo de agrupamento realizado aplicando SOM. Fonte: Adaptado de Goodacre *et. al.* (1994).

## 2.3 OBJETIVO GERAL

Aplicar metodologias de análise multivariada para selecionar leveduras com potencial para produção de cerveja.

### 2.3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a eficiência fermentativa de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* para produção de cerveja puro malte de cevada;
- ✓ Aplicar e avaliar as metodologias Análise de Componentes Principais, Análise de Agrupamentos Hierárquicos e Redes Neurais Artificiais para seleção de leveduras com potencial para produção de cerveja.

## 2.4 METODOLOGIA

### 2.4.1 LEVEDURAS

As leveduras utilizadas na pesquisa são provenientes de projetos de pesquisa anteriores (PINHEIRO, 2012; SILVA, 2009), já devidamente identificadas bioquimicamente e molecularmente como *Saccharomyces cerevisiae* por SILVA (2009), além de diferenciadas intraespecificamente quanto a tolerância ao etanol, osmotolerância, a termotolerância, a produção de H<sub>2</sub>S, a capacidade de floculação e a fermentação em batelada, por PINHEIRO (2012). Estão preservadas e estocadas nos laboratórios LAPEM e LABMA. Como controle foram utilizadas leveduras cervejeiras comerciais, fabricante *Fermentis*, S-23 (*lager*) e S-04 (*ale*), adquiridas em lojas especializadas do setor. A cultura estoque foi mantida em tubos de ensaio, inclinado, contendo ágar Sabouraud, e conservada sob refrigeração a 4°C. A Tabela 2.1 apresenta a relação das leveduras utilizadas.

Tabela 2.1: Cepas de leveduras utilizadas no experimento e respectivos locais de origem

<b>Local</b>	<b>Bioma</b>	<b>Código</b>
Ibirataia/BA	Mata Atlântica	SC01
Ibirataia/BA	Mata Atlântica	SC37
Ibirataia/BA	Mata Atlântica	SC52
Jaguaripe/BA	Mata Atlântica	SC57
Jaguaripe/BA	Mata Atlântica	SC62
Jaguaripe/BA	Mata Atlântica	SC82
Condeúba/BA	Caatinga	SC174
Condeúba/BA	Caatinga	SC175
Condeúba/BA	Caatinga	SC184
Rio de Contas/BA	Mata Atlântica	SC220
Bélgica	-----	S-23*
Bélgica	-----	S-04*

Adaptado de Silva, 2009. \*Leveduras comerciais (S-23, *lager*; S-04, *ale*), utilizadas como controle, adquiridas em lojas especializadas do setor

#### 2.4.2 MOSTO CERVEJEIRO

Nesta pesquisa optou-se pela produção de cerveja puro malte. O mosto cervejeiro foi produzido com as seguintes matérias primas:

- ✓ água, do tipo mineral, obtida no comércio local do Município de Feira de Santana, Bahia;
- ✓ malte de cevada, claro, do tipo Pilsen, originário da Bélgica, adquirido em empresas especializadas do setor cervejeiro, fornecido em sacos de 25 kg; e
- ✓ lúpulo, sendo um aromático e o outro de amargor, da marca Hopsteiner, adquiridos em empresas especializadas do setor: Lúpulo aromático (em Pellets tipo 90, com aproximadamente 7% de ácidos alfa, origem E.U.A); e Lúpulo de amargor (em Extrato CO<sub>2</sub>, com aproximadamente 30% de ácidos alfa).

O mosto cervejeiro puro malte foi preparado a partir das seguintes etapas: moagem do malte, mosturação (a rampa de mosturação é apresentada na Tabela 2.2), filtragem (separação do líquido da casca do malte), e fervura, quando foram adicionados os lúpulos (de amargor, após 15 min de iniciada a fervura e aromático à 15 min do final da fervura, em que o tempo total foi de 60 min). Após a fervura, o mosto cervejeiro foi resfriado e

acondicionado em recipiente estéril com capacidade de 1L e congelado para posterior utilização nos ensaios fermentativos.

Tabela 2.2: Rampa de mosturação com as respectivas temperaturas, tempos de ativação e enzimas ativadas

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Enzimas</b>
35	20	Hemicelulases
45	10	Exopeptidases
52	10	Endopeptidases
62	20	Dextrinases e beta-amilases
72	20	Alfa-amilases
76	10	Inativação

#### 2.4.3 CULTIVO E PROPAGAÇÃO DE LEVEDURAS

A partir da cultura estoque, as cepas foram repicadas e inoculadas em 3 placas de petri, contendo ágar Sabouraud e mantidas em estufa à 30°C, por 24 h. Em seguida, os repiques foram transferidos, por raspagem superficial do Agar, com uso de alça de platina e em condições assépticas em Cabine de Segurança Biológica (CSB), para um frasco erlenmeyer de 250 mL, contendo mosto cervejeiro (125 mL) a 12°P ( $\pm 0,5^\circ\text{P}$ ), para iniciar a etapa de propagação. O frasco foi incubado a 30°C, em agitador rotatório a 150 rpm, por 24 h. A etapa de fermentação foi iniciada após verificar a concentração do inóculo no frasco ( $1-2 \times 10^8$  cel mL<sup>-1</sup>). Utilizou-se o volume máximo de 10% da propagação, necessário para atingir uma concentração celular entre  $1-2 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup> no início da fermentação.

#### 2.4.4 FERMENTAÇÃO

A fermentação foi conduzida em escala de bancada, em erlenmeyer de 500 mL, sendo utilizado um volume útil de 250 mL, dos quais 225 mL provenientes do mosto advindo da fervura e 25 mL de mosto proveniente da propagação.

Com a finalidade de promover o revigoramento e um rápido crescimento das leveduras, nas 12 horas iniciais da etapa de fermentação o erlenmeyer foi mantido fechado com capuchão estéril, possibilitando a via respiratória da levedura, energeticamente mais eficiente. Em seguida foi realizada a troca do capuchão estéril por válvula tipo airlock, para fechar o sistema, garantindo as condições anaeróbicas, bem como para facilitar a coleta de

amostras durante a fermentação. Esta via fermentativa resulta na produção da cerveja através da conversão do açúcar presente no mosto em etanol e gás carbônico.

#### 2.4.5 ACOMPANHAMENTO ANALÍTICO DOS EXPERIMENTOS

Durante todo o processo fermentativo foram retirados 5 mL de amostras periódicas, em intervalos de 12 h, até o término da fermentação. O tempo final da fermentação foi determinado quando se alcançou o ponto de atenuação (concentração de açúcares não fermentescíveis do ensaio do ponto final).

As amostras foram degaseificadas pela agitação vigorosa dos tubos falcon durante 1 min. Em seguida foram centrifugadas a 5400 g por 10 min e o sobrenadante obtido após a centrifugação foi utilizado para quantificar: extrato aparente (ou concentração aparente de açúcares totais), expresso em °P; concentração de etanol, em % v v<sup>-1</sup>; densidade do mosto, expressa em g mL<sup>-1</sup>; e grau aparente de fermentação, em %, determinados em equipamento analisador de cerveja, Beer Analyser *Anton Parr*.

As concentrações do glicerol e dos açúcares maltose e maltotriose foram determinadas nos pontos inicial e final da fermentação, a fim de determinar o percentual de produção/consumo destes. As determinações foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), em equipamento marca Agilent, equipado com forno, injetor automático de amostras, detector de índice de refração marca Agilent 1100/1200, coluna BIORAD FSX-87H. A fase móvel usada foi uma mistura de acetonitrila : água em diferentes proporções, com vazão de 100 µL min<sup>-1</sup>, na temperatura de 35 °C. Antes da determinação por HPLC, as amostras foram degaseificadas e centrifugadas a 5400 g por 10 min, sendo os sobrenadantes filtrados em filtros 0,45 µm (Millipore) e diluídos em água deionizada, na proporção de 1:10 e posteriormente injetados no cromatógrafo. As concentrações de maltose e maltotriose foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas de soluções padrão.

A concentração de células em suspensão foi determinada por metodologia de contagem em câmara de Neubauer (1/400 mm<sup>2</sup> x 1/10 mm) e expressa em cel mL<sup>-1</sup>. A determinação da viabilidade celular (células viáveis e não viáveis) foi realizada pelo Método Internacional de coloração com azul de metileno, segundo ASBC (1996).

## 2.4.6 METODOLOGIA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS E SELEÇÃO DAS LEVEDURAS

Leveduras produtoras de cerveja devem apresentar as seguintes características: velocidade rápida de fermentação, sem crescimento celular excessivo; utilização eficiente da maltose e maltotriose; produção de etanol; habilidade de tolerar o estresse imposto pelas altas concentrações de álcool e pressões osmóticas do mosto (PRIEST & CAMPBELL, 1996).

Para a seleção das leveduras foram aplicadas as metodologias Análise de Componentes Principais (ACP), Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH) e Redes Neurais Artificiais (RNA), sendo aplicada a técnica dos Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen. Foram utilizados para análise os fatores: Consumo de maltose, Consumo de maltotriose, Produção de Glicerol, Grau Aparente de Fermentação (GFA) e Produção de Etanol (Et). As cepas comerciais S-23 (*lager*) e S-04 (*ale*) foram utilizadas como parâmetro de comparação (leveduras controle).

## 2.4.7 ANÁLISE E TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados foram analisados e tratados nos programas estatísticos MATLAB R2013a e STATÍSTICA 8.0. Foi adotado o nível de significância de 5%, sendo aplicado o Teste de Tukey para comparação entre as médias dos dados obtidos.

## 2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 2.5.1 CONCENTRAÇÃO E VIABILIDADE CELULAR

Para a produção de qualquer bebida alcoólica, a fermentação consiste ponto central, tendo como principal objetivo a conversão dos açúcares presentes no substrato em etanol e gás carbônico pela ação das leveduras, sendo a sua concentração e viabilidade celular fundamental para o processo, as quais são apresentadas nas Figuras 2.3 e 2.4.

Embora as circunstâncias variem de mostos para mostos e de cepas para cepas, uma fermentação requererá 1 ppm de oxigênio dissolvido e  $10^6$  cel mL<sup>-1</sup>, por cada 1° P de extrato no mosto (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001). Desta forma, tendo em vista que o

mosto cervejeiro produzido continha  $12^\circ$  P de extrato, o ideal para o referido processo fermentativo correspondia a  $1,2 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup> e conforme pode ser observado nas Figuras 2.3 e 2.4 as concentrações celulares mantiveram-se acima do recomendável para todas as leveduras estudadas, evidenciando a viabilidade de todas as cepas utilizadas.

O perfil de crescimento celular foi semelhante em ambas as temperaturas de fermentação. Para a condição de temperatura de  $22^\circ$  C (Figura 2.4) o crescimento celular foi superior para todas as leveduras estudadas, quando comparado ao processo fermentativo realizado a  $15^\circ$  C (Figura 2.3). A diminuição da temperatura de fermentação incorre em menores concentrações de células em suspensão, independente da concentração de extrato presente no mosto cervejeiro (RAMIREZ & MACIEJOWSKI, 2007; CARVALHO, 2009; DRAGONE, 2002).

Nas Figuras 2.3 e 2.4 também é possível observar a inexistência da fase Lag (de adaptação), o que se deve ao fato de que as leveduras passaram por um processo de propagação no próprio mosto cervejeiro, com o objetivo de aumentar a biomassa e favorecer a adaptação ao meio. Para a temperatura de fermentação de  $15^\circ$  C (Figura 2.3), o máximo crescimento celular variou entre 60 h e 72 h, quando se iniciou a fase estacionária. Na temperatura de  $22^\circ$  C (Figura 2.4), o crescimento celular máximo variou entre 48 h e 60 h. Ao final da fermentação, independente da temperatura, a concentração celular foi na ordem de  $10^7$  cel mL<sup>-1</sup>.

Dentre as leveduras estudadas as cepas SC52, SC57 e SC82 apresentaram o maior crescimento celular, inclusive quando comparadas às cepas comerciais (S-23 e S-04) utilizadas como controle.

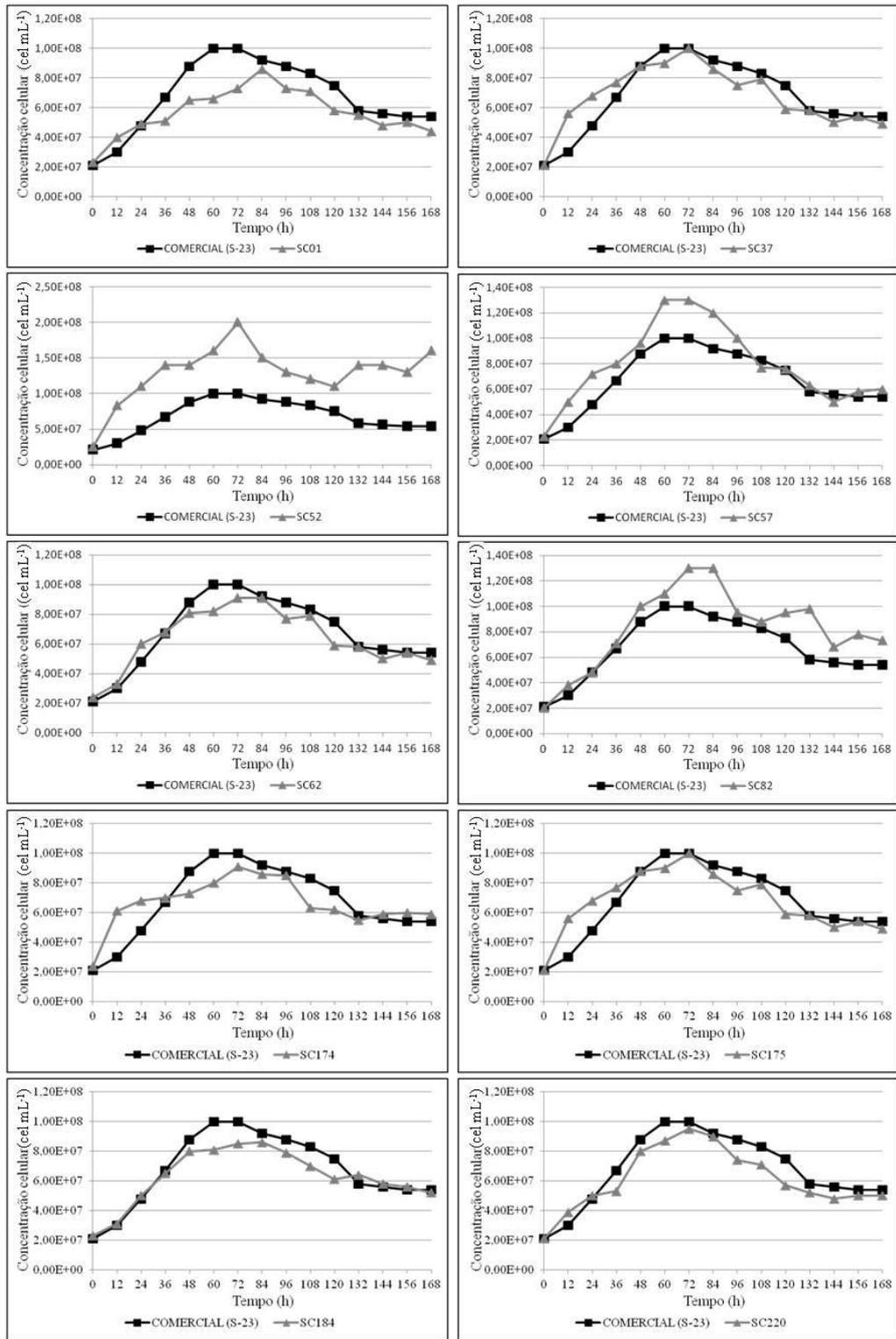


Figura 2.3 – Crescimento celular de leveduras, fermentadas à temperatura de 15°C.

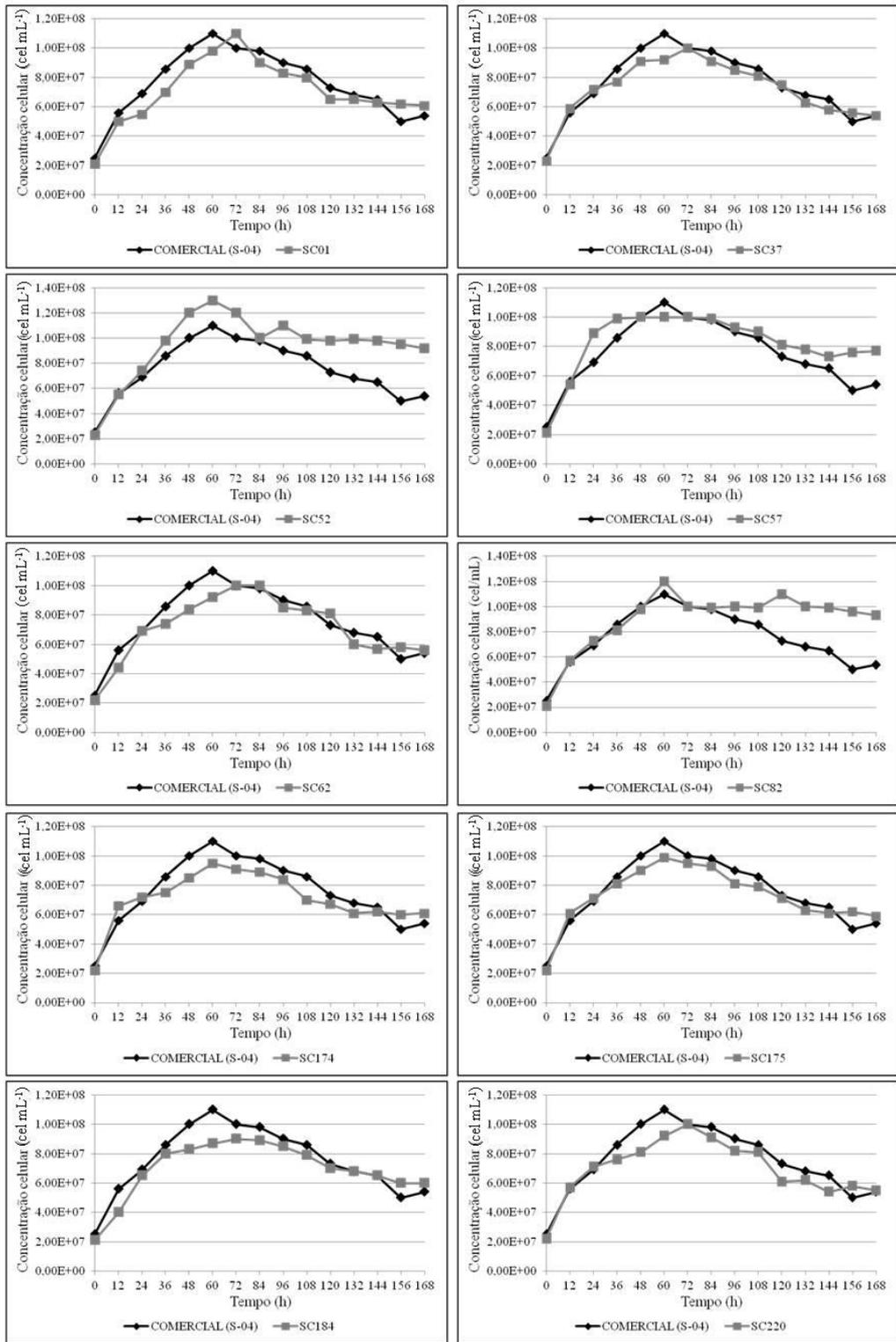


Figura 2.4 – Crescimento celular de leveduras, fermentadas à temperatura de 22°C.

## 2.5.2 EXTRATO APARENTE, PRODUÇÃO DE ETANOL E GRAU APARENTE DE FERMENTAÇÃO

Uma atenuação aparente superior a 50% é considerada satisfatória em processos de produção de cerveja (HENDGES, 2014; MANZANO, *et. al.*, 2005). Nesta pesquisa em fermentação conduzida em temperatura a 15° C (*Lager*), o Grau Aparente de Fermentação variou entre 43,83% (SC174) e 75% (SC52), destacando-se as leveduras SC52 (75%), SC57 (72,5%) e SC82 (74,08%), sendo que a SC52 não diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) da levedura comercial *Lager* S-23 (74,92%). A atenuação foi obtida após 120 h de fermentação. O Extrato Aparente residual variou entre 30,40 g L<sup>-1</sup> (SC52) a 62,44 g L<sup>-1</sup> (SC37). As leveduras SC52, SC57 e SC82 apresentaram os menores valores, o que representa um maior consumo do extrato presente no mosto, superiores inclusive à levedura comercial *lager* S-23. A levedura SC52 diferiu estatisticamente das demais, apresentando o maior consumo de extrato. Não houve diferença significativa entre as leveduras SC57 e SC82. A produção de etanol variou entre 27,3 g L<sup>-1</sup> (SC37) e 47,1 g L<sup>-1</sup> (SC52). Para este parâmetro as leveduras SC52, SC57 e SC82 também apresentaram os maiores valores de produção, superiores à levedura comercial *lager* S-23 (41,3 g L<sup>-1</sup>). As leveduras SC57 e SC82 não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), apresentando os mesmos níveis de produção de etanol, 45,05 g L<sup>-1</sup>.

Na condição de fermentação a 22°C (*Ale*) as leveduras SC52, SC57 e SC82 também se destacaram por apresentarem os melhores desempenhos, inclusive quando comparadas a levedura comercial S-04, com destaque para a levedura SC52, que diferiu estatisticamente ( $p > 0,05$ ) das demais leveduras, para os itens extrato aparente e produção de etanol, apresentando os melhores resultados. O Grau Aparente de Fermentação variou entre 55,92% e 72,50%, sendo que as leveduras que apresentaram melhor desempenho (SC52, SC57 e SC82), quando comparadas com a levedura comercial (S-04) não diferiram significativamente ( $p > 0,05$ ) entre si. O Extrato Aparente variou de 30,40 g L<sup>-1</sup> (SC52) a 62,44 g L<sup>-1</sup> (SC37), quando se atingiu a atenuação (108 h de fermentação), com destaque para as leveduras SC52, SC57 e SC82 que apresentaram os menores valores de extrato aparente, resultando numa maior produção de Etanol. A levedura SC52 destacou-se com a maior produção de etanol, 47,91 g L<sup>-1</sup>. As leveduras SC57 e SC82 não diferiram estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), apresentando os mesmos níveis de produção de etanol (47,22 g L<sup>-1</sup>), superiores à levedura

comercial S-04 (44,74 g L<sup>-1</sup>). Tais resultados também foram superiores aos encontrados por KROGERUS, et. al. (2015), de 44,18 g L<sup>-1</sup>, em trabalho de seleção de leveduras tipo *lager*. Na Tabela 2.3 são apresentados os dados de extrato aparente, produção de etanol e grau aparente de fermentação obtidos ao final da fermentação nas temperaturas de 15° C e 22° C.

O aumento da temperatura favorece o consumo do extrato aparente (concentração aparente dos açúcares totais), diminuindo o tempo de fermentação (RAMIREZ & MACIEJOWSKI, 2007; CARVALHO, 2009). Na Figura 2.5 são apresentados os perfis de consumo de Extrato Aparente e Produção de Etanol, em que podemos observar que a produção de Etanol é inversamente proporcional ao consumo de Extrato Aparente, sendo que para todas as leveduras estudadas o consumo de Extrato Aparente e, por conseguinte, a produção de Etanol foi maior nas fermentações realizadas à temperatura superior (22 °C).

Tabela 2.3: Valores médios e desvio padrão dos teores de extrato aparente, etanol e grau aparente de fermentação, obtidos em condições de fermentação a 15° C e 22° C em mosto cervejeiro puro malte

Levedura	Extrato aparente (g L <sup>-1</sup> )		Etanol (g L <sup>-1</sup> )		Grau Aparente de Fermentação (%)	
	15° C	22° C	15° C	22° C	15° C	22° C
Controle**	43,65 ± 0,35 <sup>c</sup>	35,42 ± 0,01 <sup>c</sup>	41,30 ± 0,20 <sup>g</sup>	44,74 ± 0,18 <sup>f</sup>	74,92 ± 0,10 <sup>i</sup>	72,50 ± 0,11 <sup>e</sup>
SC01	55,73 ± 0,60 <sup>f</sup>	55,59 ± 0,13 <sup>f</sup>	35,27 ± 0,00 <sup>d</sup>	35,82 ± 0,35 <sup>d</sup>	54,23 ± 0,65 <sup>c</sup>	55,92 ± 0,23 <sup>a</sup>
SC37	71,75 ± 0,28 <sup>i</sup>	62,44 ± 0,05 <sup>g</sup>	27,30 ± 0,32 <sup>a</sup>	32,43 ± 0,03 <sup>a</sup>	54,26 ± 0,31 <sup>c</sup>	58,25 ± 0,20 <sup>c</sup>
SC52	31,03 ± 0,00 <sup>a</sup>	30,40 ± 0,01 <sup>a</sup>	47,10 ± 0,01 <sup>i</sup>	47,91 ± 0,01 <sup>h</sup>	75,00 ± 0,00 <sup>i</sup>	75,00 ± 0,02 <sup>f</sup>
SC57	34,10 ± 0,10 <sup>b</sup>	31,58 ± 0,01 <sup>b</sup>	45,05 ± 0,04 <sup>h</sup>	47,22 ± 0,01 <sup>g</sup>	72,50 ± 0,00 <sup>g</sup>	75,00 ± 0,10 <sup>f</sup>
SC62	54,66 ± 0,20 <sup>e</sup>	56,39 ± 0,01 <sup>f</sup>	35,90 ± 0,00 <sup>e</sup>	35,35 ± 0,52 <sup>c,d</sup>	57,71 ± 0,01 <sup>e</sup>	56,52 ± 0,25 <sup>b</sup>
SC82	34,10 ± 0,10 <sup>b</sup>	31,86 ± 0,02 <sup>b</sup>	45,05 ± 0,23 <sup>h</sup>	47,22 ± 0,05 <sup>g</sup>	74,08 ± 0,01 <sup>h</sup>	74,75 ± 0,35 <sup>f</sup>
SC174	50,55 ± 0,05 <sup>d</sup>	51,08 ± 0,49 <sup>d</sup>	36,77 ± 0,00 <sup>f</sup>	36,61 ± 0,18 <sup>e</sup>	58,33 ± 0,00 <sup>f</sup>	59,19 ± 0,08 <sup>d</sup>
SC175	69,42 ± 0,10 <sup>h</sup>	50,59 ± 0,65 <sup>d</sup>	28,88 ± 0,00 <sup>b</sup>	35,03 ± 0,42 <sup>b,c</sup>	43,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	56,41 ± 0,36 <sup>b</sup>
SC184	56,43 ± 0,53 <sup>f</sup>	54,26 ± 0,21 <sup>e</sup>	35,27 ± 0,00 <sup>d</sup>	36,77 ± 0,11 <sup>e</sup>	53,93 ± 0,00 <sup>b</sup>	58,18 ± 0,19 <sup>c</sup>
SC220	65,28 ± 0,53 <sup>g</sup>	55,76 ± 0,72 <sup>e,f</sup>	29,90 ± 0,32 <sup>c</sup>	34,72 ± 0,21 <sup>b</sup>	56,88 ± 0,00 <sup>d</sup>	56,72 ± 0,10 <sup>b</sup>

\*Valores entre as médias parciais assinalados com a mesma letra, na mesma coluna, não diferem significativamente (p>0,05) entre si, segundo Teste de Tukey.

\*\* Controle: dados apresentados para temperatura de 15° C referem-se à levedura comercial S-23 e para temperatura de 22° C à levedura comercial S-04.

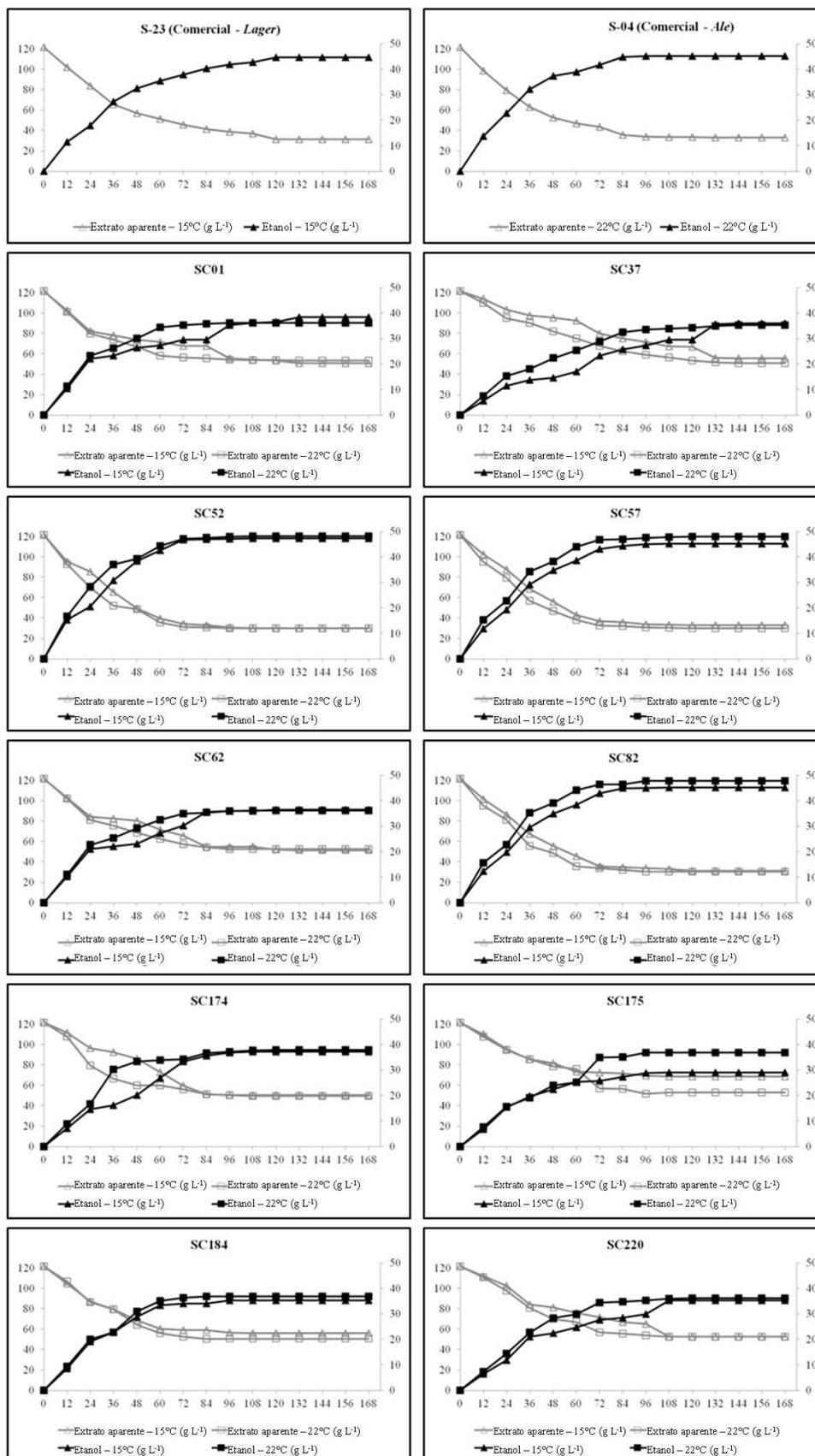


Figura 2.5 – Consumo de Extrato Aparente e Produção de Etanol, por leveduras em fermentação à 15°C e à 22°C

### 2.5.3 CONCENTRAÇÃO DE AÇÚCARES E GLICEROL

O mosto cervejeiro é composto, dentre outros compostos, por maltose (50 a 60%) e maltotriose (15 a 20%), sendo que a eficiência do processo de fermentação das cervejas está diretamente relacionada à capacidade de fermentação destes açúcares (ALVES JR., *et. al.*, 2008).

O glicerol, o mais abundante dos compostos orgânicos secundários da fermentação, tem a sua formação acoplada à manutenção do equilíbrio redox celular, o qual é alterado com a formação de ácidos orgânicos, biomassa e da presença de sulfito no mosto. A formação de glicerol também está relacionada a uma resposta ao estresse osmótico, quando de concentrações elevadas de açúcares ou de sais no mosto (ALVES JR., *et. al.*, 2001; WALKER, 2000). Na Tabela 2.4 são apresentados os teores iniciais de maltose, maltotriose e glicerol, obtidos no início (mosto) e ao final da fermentação.

Tabela 2.4: Teores de maltose, maltotriose e glicerol em fermentações em mosto puro malte (12 °P) com leveduras selecionadas e comerciais, nas temperaturas de 15 °C (*lager*) e 22 °C (*ale*), ao término do processo fermentativo.

Leveduras	Maltose (g L <sup>-1</sup> )		Maltotriose (g L <sup>-1</sup> )		Glicerol (g L <sup>-1</sup> )	
	15 °C	22 °C	15 °C	22 °C	15 °C	22 °C
Mosto	54,22		14,72		0,00	
Comercial**	3,59	2,81	6,37	4,85	2,50	2,30
SC01	11,76	8,11	14,34	15,05	4,80	4,25
SC37	11,60	2,93	13,78	15,53	4,50	4,15
SC52	4,86	3,30	9,50	7,48	1,17	1,15
SC57	10,76	5,59	9,72	7,48	1,25	1,17
SC62	18,57	10,86	12,03	14,04	3,50	3,00
SC82	10,32	3,84	9,66	9,20	1,20	1,14
SC174	30,59	18,53	11,07	13,44	3,65	3,55
SC175	37,06	38,24	12,63	14,23	4,75	4,25
SC184	21,63	23,57	11,27	14,41	4,00	4,00
SC220	37,64	38,70	12,67	16,65	4,20	3,80

\*Concentrações iniciais de maltose, maltotriose e glicerol no início do processo fermentativo.

\*\*Para fermentação em temperatura de 15 °C, foi utilizada a levedura S-23 e para fermentação à 22 °C, a levedura S-04, ambas da fabricante *Fermentis*.

Em fermentação conduzida à 15°C, as leveduras SC52, SC57 e SC82 apresentaram maior consumo de maltose, evidenciado pelas menores concentrações ao final da fermentação, quando comparadas às demais leveduras estudadas. Tais leveduras consumiram acima de 80% da maltose presente no mosto. Destacaram-se, ainda, as leveduras SC01 e SC37, que consumiram, respectivamente, 78,31% e 78,60% da maltose. A levedura comercial

S-23, consumiu 93,38% da maltose presente no mosto. Em fermentação à 22° C destacaram-se as leveduras SC82 (94,60%), SC57 (93,92%), SC62 (92,92%), SC37 (89,69%), SC52 (85,04%) e SC01 (79,97%); a levedura comercial S-04 consumiu 94,82% da maltose presente no mosto cervejeiro.

Todas as leveduras consumiram acima de 70% da maltotriose presente no mosto cervejeiro, independente da temperatura de fermentação (exceto a levedura SC220 que a 22 °C consumiu pouco abaixo, 69,29%). A levedura SC57 destacou-se, apresentando o maior consumo de maltotriose para as duas temperaturas de fermentação (82,48% à 15 °C e 86,20% à 22 °C). As leveduras comerciais S-23 e S-04 consumiram 88,25% e 91,05%, respectivamente, da maltotriose presente no mosto.

Ficou evidenciado um maior consumo de maltose e maltotriose com o aumento da temperatura de fermentação, o que pode estar associado ao fato de que dificilmente encontrar-se-á na natureza leveduras *Lager*, pois esta constitui um híbrido; portanto, pode-se inferir que as leveduras em estudo são do tipo *Ale*, que de acordo com Gibson & Liti (2015) são mais eficientes durante o processo fermentativo no que se refere ao consumo de maltose e maltotriose.

Com relação à produção de glicerol, verificou-se que as leveduras SC52, SC57 e SC82 apresentaram as menores concentrações (1,15 g L<sup>-1</sup>; 1,17 g L<sup>-1</sup> e 1,14 g L<sup>-1</sup> para fermentação à 22 °C; e 1,17 g L<sup>-1</sup>; 1,20 g L<sup>-1</sup> e 1,25 g L<sup>-1</sup> para fermentação à 15 °C, respectivamente) quando comparadas com as demais leveduras estudadas, inclusive com às leveduras comerciais, que produziram 2,50 g L<sup>-1</sup> (S-23), e 2,30 g L<sup>-1</sup> (S-04). Em termos comparativos, por exemplo, 3,75 g L<sup>-1</sup> foi o teor de glicerol encontrado por Carvalho (2009) no ponto ótimo de fermentação para cerveja produzida utilizando banana como adjunto. Considerando ser o glicerol um composto secundário indesejável na produção da cerveja, os resultados obtidos foram satisfatórios.

Na Figura 2.6 (A e B) são apresentados os teores de glicerol e produção de etanol obtidos nas fermentações. Pode-se observar que, independente da temperatura de fermentação, a produção de etanol e de glicerol é inversamente proporcional, ou seja, as leveduras que apresentaram maiores teores de etanol produziram menos glicerol. Estes

resultados corroboram com o já relatado na literatura (CARVALHO, 2009; BERRY, 1989) que elevadas concentrações de glicerol resultam em menores rendimentos aparente em etanol.

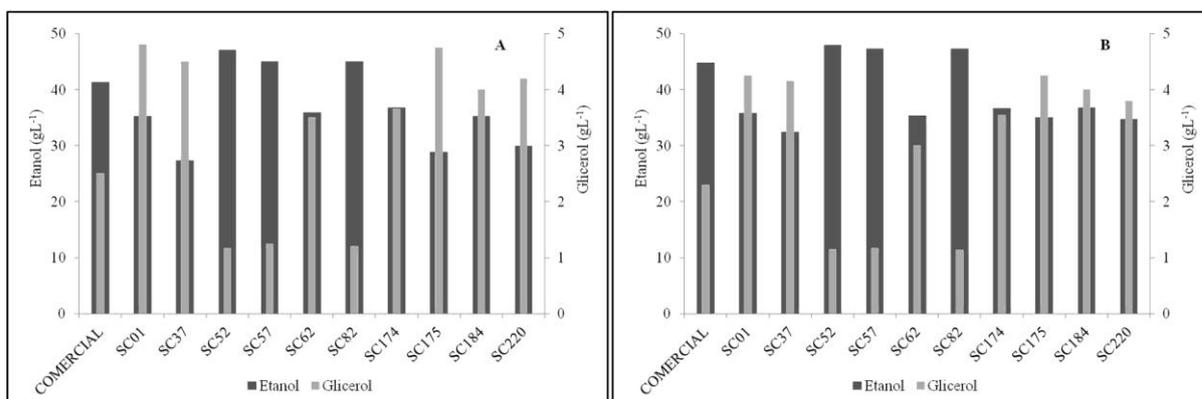


Figura 2.6 – Teores de glicerol e produção de etanol, em fermentação realizada nas temperaturas de 15 °C (A) e 22 °C (B).

#### 2.5.4 SELEÇÃO DE LEVEDURAS COM POTENCIAL CERVEJEIRO

A partir dos resultados obtidos, para a seleção das leveduras com potencial cervejeiro, foram aplicadas as metodologias de análise multivariada: Análise de Componentes Principais (ACP), Análise de Agrupamentos Hierárquicos (AAH) e Redes Neurais Artificiais (RNA).

A Análise de Componentes Principais confirmou os resultados obtidos na comparação entre as médias dos teores de Grau Aparente de Fermentação, Produção de Etanol, Extrato Aparente, Glicerol, Maltose e Maltotriose. A distribuição das amostras no gráfico ACP (Figura 2.7) mostra as diferenças existentes entre as leveduras estudadas, uma vez que leveduras com comportamento semelhantes ocupam regiões próximas no gráfico.

Através da ACP é possível explicar 91,64% da variabilidade entre as leveduras. Verifica-se que 82,02% da variação ocorrida entre as leveduras é explicada pelo primeiro componente principal (PC 1), enquanto o segundo componente principal explicou 9,62% da variabilidade. Conforme pode ser observado no gráfico, destacam-se as amostras S-23 (Comercial Lager), S-04 (Comercial Ale), SC52-15 (SC52, fermentada à 15 °C), SC52-22 (SC52, fermentada à 22 °C), SC57-15 (SC57, fermentada à 15 °C), SC57-22 (SC57, fermentada à 22 °C), SC82-15 (SC82, fermentada à 15 °C), SC82-22 (SC82, fermentada à 22 °C), que correspondem às leveduras que apresentaram os melhores resultados, já descritos anteriormente. Portanto, por meio do gráfico ACP podemos confirmar serem estas as leveduras que tendem a apresentar potencial para a produção de cerveja.

Na AAH (Figura 2.8) também observamos o agrupamento, realizado em função das menores distâncias euclidianas das leveduras S-23 (Comercial Lager), S-04 (Comercial Ale), SC52-15 (SC52, fermentada à 15 °C), SC52-22 (SC52, fermentada à 22 °C), SC57-15 (SC57, fermentada à 15 °C), SC57-22 (SC57, fermentada à 22 °C), SC82-15 (SC82, fermentada à 15 °C), SC82-22 (SC82, fermentada à 22 °C), corroborando a análise realizada pela metodologia ACP.

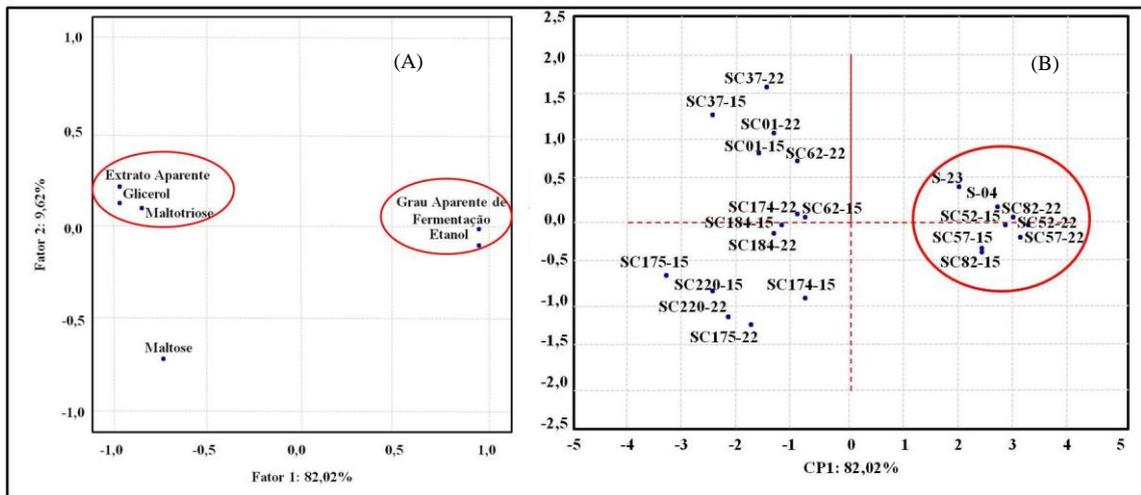


Figura 2.7 – Análise de Componentes Principais; (A) fatores/parâmetros de avaliação e (B) leveduras agrupadas

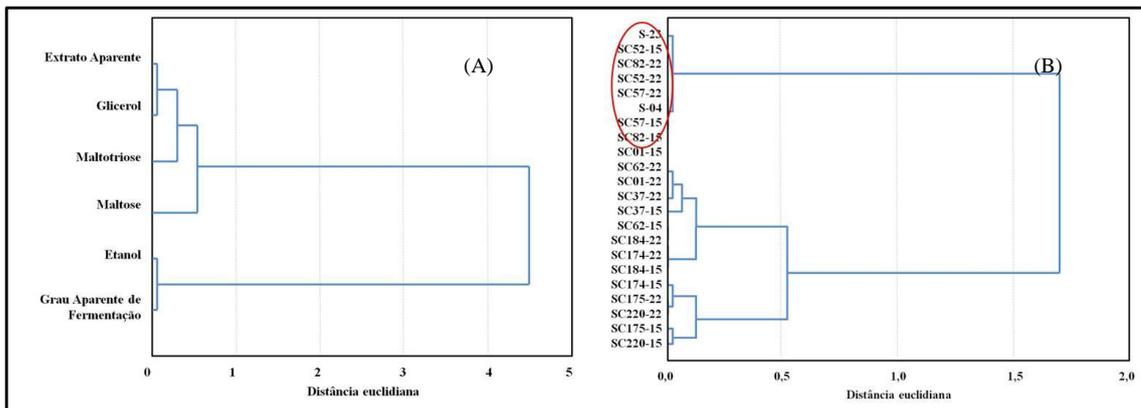


Figura 2.8 – Análise de Agrupamentos Hierárquicos; A) grupo de fatores/parâmetros de avaliação e B) leveduras agrupadas

Com o objetivo de reduzir o número de dimensões a serem analisadas, preservando a informação original de forma a facilitar a observação e interpretação dos resultados obtidos, após a aplicação da ACP e AAH, foi aplicada a técnica de Redes Neurais Artificiais – Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen (SOM).

O mapa resultante do treinamento da rede mostra a existência de grupos de neurônios com ativação similar. Estes grupos podem ser visualizados na matriz U que mostra as distâncias entre unidades do mapa vizinhas (Figura 2.9).

As distâncias maiores indicam a delimitação de grupos enquanto os valores baixos revelam neurônios de ativação semelhantes. Os elementos de um mesmo grupo possuem distâncias pequenas entre si, logo são indicados por áreas uniformes escuras com valores baixos. A análise visual da matriz U (Figura 2.9) sugere três áreas homogêneas, que indicam unidades pouco distantes entre si.

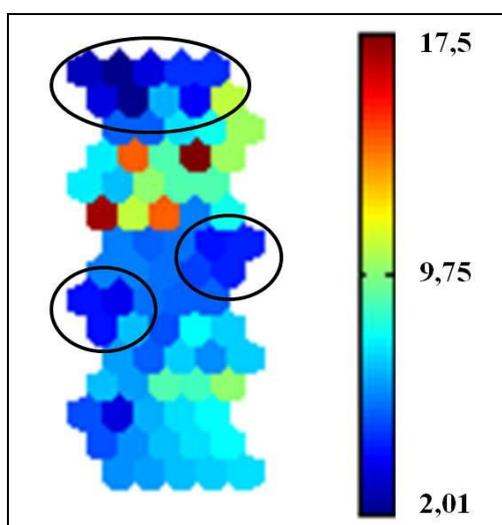


Figura 2.9 - Matriz U – Mapa 5 x 8 com 6 variáveis.  
\*A escala ao lado indica a distância entre as unidades do mapa (neurônios).

Na Figura 2.10 são apresentadas as variáveis utilizadas para a construção do SOM e na Figura 2.11 podemos observar claramente os três grupos formados, em que é possível visualizar que as leveduras SC52, SC57 e SC82 (independente da temperatura de fermentação, 15 °C ou 22 °C) estão agrupadas com as leveduras S-23 (*Lager*) e S-04 (*Ale*) utilizadas como controle para a seleção de leveduras, nos permitindo inferir que devido às similaridades apresentadas com as leveduras comerciais utilizadas como controle, estas leveduras apresentam potencial para produção de cerveja de boa qualidade, considerando as condições utilizadas.

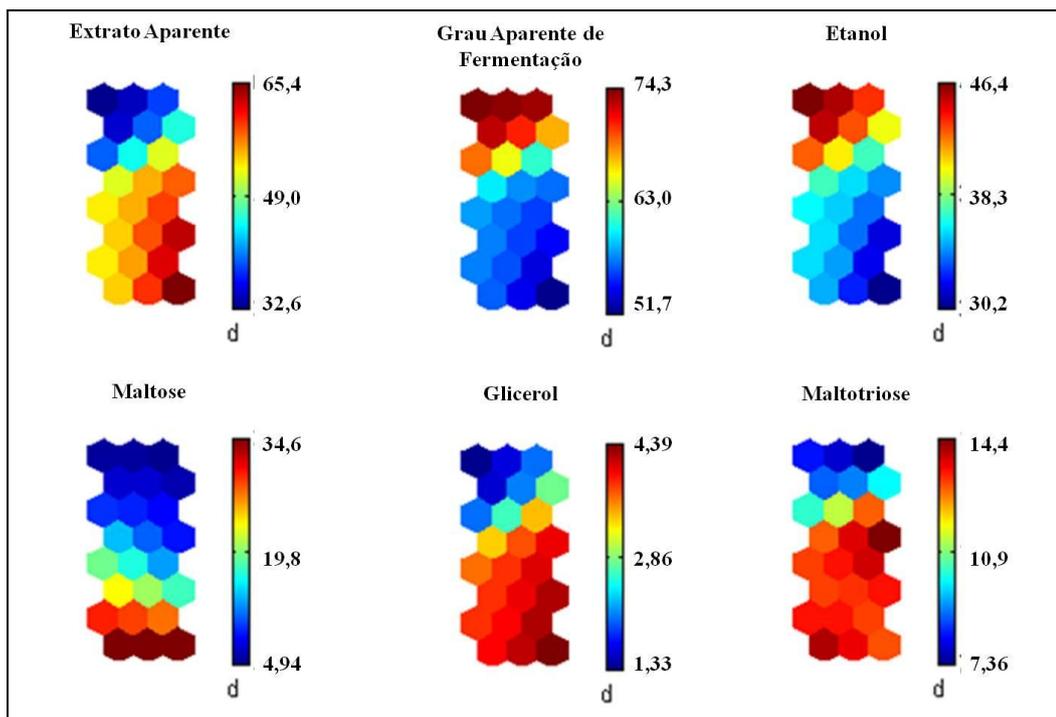


Figura 2.10 – Variáveis utilizadas para a construção dos Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen (SOM).

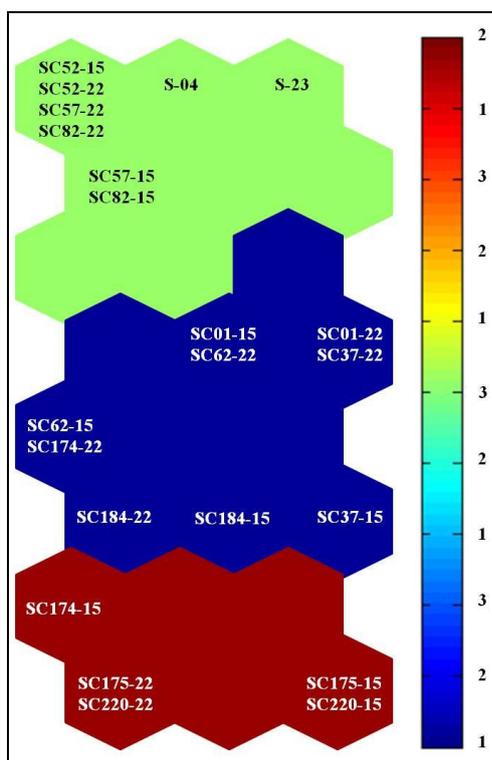


Figura 2.11 – Agrupamento e seleção de leveduras com potencial cervejeiro

## 2.6 CONCLUSÕES

Das 10 (dez) cepas de leveduras testadas, 3 (três) cepas (SC52, SC57 e SC82) apresentaram bom desempenho para a produção de cerveja quando comparadas à leveduras comerciais, nas temperaturas de 15 °C (tipo *Lager*) e 22 °C (tipo *Ale*);

O aumento da temperatura de fermentação resultou em melhores resultados fermentativos, haja vista que todos os fatores (em especial, Concentração Celular, Consumo de Extrato Aparente, Grau Aparente de Fermentação e Produção de Etanol) foram superiores em fermentação conduzida à 22 °C, quando comparados com fermentação à 15 °C;

A Análise de Componentes Principais, Análise de Agrupamentos Hierárquicos e Redes Neurais Artificiais por meio da técnica dos Mapas Auto-Organizáveis de Kohonen, se mostraram técnicas úteis na identificação das correlações e reconhecimento de padrões, permitindo uma rápida visualização dos resultados, proporcionando um melhor entendimento e facilitando o processo de seleção a partir dos grupamentos formados. Portanto, podemos concluir que as técnicas de análise exploratória aplicadas são indicativas para trabalhos de seleção de leveduras com potencial cervejeiro, utilizando leveduras comerciais como parâmetro de controle.

## 2.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCÁZAR, A.; PABLOS, F.; MARTÍN, M. J.; GONZÁLEZ, A. G. Multivariate characterisation of beers according to their mineral content. *Talanta*, 57 (2002), pp. 45–52.

ALONSO-SALCES, R. M.; GUYOT, S.; HERRERO, C.; BERRUETA, L. A.; DRILLEAU, J. F.; GALLO, B.; VICENTE, F. Chemometric classification of Basque and French ciders based on their total polyphenol contents and CIELab parameters. *Food Chemistry*, 91 (2005), pp. 91–98.

ALVES JR, S. L.; HERBERTS, R. A.; HOLLATZ, C.; TRICHEZ, D.; MILLETI, L. C.; ARAUJO, P. S.; STAMBUK, B. U. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the AGT1 permease. *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (2008), pp. 1494-1501.

ASBC – *Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists*. Eighth Revised Edition. Minnesota: The Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1996.

BELTRÁN, N. H.; DUARTE-MERMOUD, M. A.; BUSTOS, M. A.; SALAH, S. A.; LOYOLA, E. A.; PEÑA-NEIRA, A. I.; JALOCHA, J. W. Feature extraction and classification of Chilean wines. *Journal of Food Engineering*, 75 (2006), pp. 1–10.

BERRY, D. R. Growth of yeast. In: NEWAY, J. O. *Fermentation process development of industrial organisms*. New York: Marcel Dekker, 1989. p. 277-310.

BRIGS, D. E.; BOLTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. *Brewing: Science and Practice*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004, 863p.

CARVALHO, G. B. M. *Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante*. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Eng. de Lorena da USP. São Paulo, 2009.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1º Parte – As Leveduras. *Revista Analytica*, São Paulo, nº 25, p. 36-42, 2006.

CEREDA, M. P. Cervejas. In: AQUARONE *et al.* *Biotecnologia alimentos e bebidas produzidos por fermentação*. Sao Paulo: Edgar Blucher, 1983. Cap. 3, p. 46.

CIOSEK, P.; BRZÓZKA, Z.; WRÓBLEWSKI, W. Electronic tongue for flow-through analysis of beverages. *Sensors and Actuators B*, 118 (2006), pp. 454–460.

CIOSEK, P.; BRZÓZKA, Z.; WRÓBLEWSKI, W.; MARTINELLI, E.; DI NATALE, C.; D'AMICOB, A. Direct and two-stage data analysis procedures based on PCA, PLS-DA and ANN for ISE-based electronic tongue - Effect of supervised feature extraction. *Talanta*, 67 (2005), pp. 590-596.

CIOSEK, P.; WRÓBLEWSKI, W. The recognition of beer with flow-through sensor array based on miniaturized solid-state electrodes. *Talanta*, 69 (2006), pp. 1156–1161.

CURI, R. A. *Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte*. 2006. xi, 123 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/101727>>. Acessado em 15 de setembro de 2015.

DRAGONE, G. *Estudo cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados*. 2002. 111p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.

DRAGONE, G.; ALMEIDA e SILVA, J. B. Cerveja. In VENTURINI FILHO, W. G. *Bebidas alcoólicas: Ciência e tecnologia*. v. 1 São Paulo: Blucher, 2010. p. 31-33.

DU, C. J.; SUN, D. W. Comparison of three methods for classification of pizza topping using different colour space transformations. *Journal of Food Engineering*, 68 (2005), pp. 277-287.

FERNANDES, R. C. S. *Análise de aglomerados das sequências da protease do HIV-1 de indivíduos infectados utilizando mapa auto organizável e k-médias*. Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Biomédica, 2010.

GIBSON, B.; LITI, G. *Saccharomyces pastorianus*: genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32 (2015), pp. 17-27.

GONZALEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEIROL, A. Molecular Characterization of New Natural Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in Brewing. *Applied Environmental and Microbiology*, 74 (2008), pp. 2314-2320.

GOODACRE, R., HOWELL, S.A., NOBLE, W.C., NEAL, M.J. 1994. Sub-species discrimination using pyrolysis mass spectrometry and self-organizing neural networks of *ropionibacterium acnes* isolated from normal human skin. *Zbl. Bakt.* 22, 124-136

HENDGES, D. H. *Produção de cervejas com teor reduzido de etanol, contendo quinoa malteada como adjunto*. 2014. 93p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena. Lorena-SP, 2014.

JACK, F. R.; STEELE, G. M. Chemometric classification of Basque and French ciders based on their total polyphenol contents and CIELab parameters. *Food Quality and Preference*, 13 (2002), pp. 163–172.

JOHNSON, E.A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. Yeast biotechnology. In: KURTZMAN, C.P.; FELL, J.W.; BOEKHOUT, T. (Ed.). *The yeasts: a taxonomic study*. 5th ed. New York: Elsevier, 2011. p.626-627.

KANGAS, J.; KOHONEN, T.; LAAKSONEN, J. Variants of self-organizing maps. *IEEE Transactions on Neural Networks*, vol. 1 (1990), n. 1, pp. 93-99.

KOHONEN, T.; OJA, E.; SIMULA, O.; VISA, A.; KANGAS, J. Engineering applications of the self-organizing map. *Proceedings of the IEEE*, v.84 (1996), n.10, pp. 1358-1384.

KROGERUS, K; MAGALHÃES, F; VIDGREN, V; GIBSON, B. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal Ind Microbiol Biotechnol* (2015) 42:769–778. DOI 10.1007/s10295-015-1597-6.

KRUZLICOVA, D; MOCÁK, J; BALLA, B; PETKA, J; FARKOVA, M; HAVEL, J. Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Food Chemistry*, 112 (2009), pp. 1046-1052.

LIBKIND, D.; HITTINGER, C.; VALERIO, E.; GONÇALVES, C.; DOVER, J.; JOHNSTON, M.; GONÇALVES, P.; SAMPAIO, J. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (2011), pp. 14539-14544.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILA, M. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, 65 (1998), pp. 85-98.

MANZANO, M.; GIUSTO, C.; BARTOLOMEOLI, I.; COMI, G. Microbiological Analyses of Dry and Slurry Yeasts for Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 111 (2005), pp. 203-208.

MARINI, F. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Analytica Chimica Acta*, 635 (2009), pp. 121-131.

MARINI, F.; BALESTRIERI, F.; BUCCI, R.; MAGRI, A. L.; MARINI, D. Supervised pattern recognition to discriminate the geographical origin of rice bran oils: a first study. *Microchemical Journal*, 74 (2003), pp. 239-248.

MOITA NETO, J. M., MOITA, G. C. *Uma Introdução à Análise Exploratória de Dados Multivariados*. Química Nova. São Paulo, SP: v. 21, n. 4, p. 467-469, 1998.

MORAIS, J. T. G. *Análise de Componentes Principais Integrada a Redes Neurais Artificiais para Predição de Matéria Orgânica*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Industrial. Universidade Federal da Bahia. Salvador, Bahia, 2011.

PENZA, M.; CASSANO, G. Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Analytica Chimica Acta*, 509 (2004), pp. 159-177.

PINHEIRO, C. S. R. *Seleção de leveduras produtoras de etanol como suporte para a produção de álcool combustível e cachaça artesanal por produtores rurais*. 2012. 94p. Tese de Doutorado (Doutor em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2012.

PRIEST, F. G; CAMPBELL, I. (eds.) *Brewing Microbiology*. 2nd ed. Chapman & Hall, London, 1996.

RAGAZZO-SANCHEZ, J. A.; CHALIER, P.; CHEVALIER, D.; CALDERON-SANTOYO, M.; GHOMMIDH, C. Classification of Slovak white wines using artificial neural networks and discriminant techniques. *Sensors and Actuators B*, 134 (2008), pp. 43-48.

RAMIREZ, W. F.; MACIEJOWSKI, J. Optimal Beer Fermentation. *Journal of The Institute of Brewing*, 113(2007), pp. 325–333.

RAPTIS, C. G.; SIETTOS, C. I.; KIRANOUDIS, C. T.; BAFAS, G. V. Classification of aged wine distillates using fuzzy and neural network systems. *Journal of Food Engineering*, 46 (2000), pp. 267–275.

SILVA, A. F. *Caracterização genética de linhagens de Saccharomyces cerevisiae isoladas de fermentações artesanais de cachaças da Bahia*. 2009. 117p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2009.

SILVA, G. A.; AUGUSTO, F.; POPPI, R. J. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC. *Food Chemistry*, 111 (2008), pp. 1057–1063.

SILVA, J. B. A. Cerveja. In: VENTURINI, W. G. Filho. *Tecnologia de bebidas*. São Paulo: Edgar Blucher, 2005. Cap. 15 p. 353.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Microbiologia*. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 964p.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: ALMEIDA LIMA, U.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial*. v. 4. Biotecnologia na Produção de Alimentos. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. p.91-144.

WALKER, G. M. Yeast Physiology and Biotechnology, In: *Yeast Technology*. Scotland: Wiley, p. 265-320, 2000.

ZANINI, A. *Regulação econômica no Setor Elétrico Brasileiro: Uma metodologia para definição de fronteiras de Eficiência e cálculo do fator X para empresas distribuidoras de Energia Elétrica*. Tese de D.Sc., PUC/RJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2004.

ZUPAN, J.; NOVIC, M.; LI, X.; GASTEIGER, J. Classification of multicomponent analytical data of olive oils using different neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 292 (1994), pp. 219-234.

## **CAPÍTULO 3**

### **OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA SUPLEMENTADA COM SELÊNIO**

## OTIMIZAÇÃO DE PARÂMETROS PARA PRODUÇÃO DE CERVEJA SUPLEMENTADA COM SELÊNIO

### RESUMO

O selênio (Se) é considerado um mineral essencial à saúde humana devido as suas funções antioxidantes, bem como por sua deficiência estar relacionada à ocorrência de várias doenças em seres humanos. As *Saccharomyces cerevisiae* são as leveduras responsáveis pela fermentação durante o processo de produção de cerveja e possuem a capacidade de acumular selênio e biodisponibilizá-lo na forma proteica, que é mais facilmente assimilável pelo organismo. Entretanto, a capacidade de acúmulo é limitada e elevados níveis de selênio são tóxicos ao ser humano. Neste contexto, para a produção de cerveja suplementada com selênio é necessário otimizar os parâmetros fermentativos, sendo este o objetivo desta pesquisa. Foi utilizada a Metodologia de Superfície de Respostas, aplicando o Planejamento Doehlert 3x5, tendo como variáveis independentes a temperatura de fermentação e concentração de selênio (na forma de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) e a produtividade volumétrica em etanol e grau aparente de fermentação como variáveis dependentes. Foram utilizadas as leveduras SC52, SC57 e SC82, previamente selecionadas como boas produtoras de cerveja (CAPITULO 2). As fermentações realizadas com as leveduras SC52 e SC82 apresentaram resultados estatísticos significativos, sendo os parâmetros fermentativos otimizados para a produção de cerveja de 25,0° C e 11 mg L<sup>-1</sup> de Se e 23,5° C e 12 mg L<sup>-1</sup> de Se, respectivamente. A levedura SC57 não apresentou resultados estatísticos significativos, não sendo indicada para a produção de cerveja suplementada com selênio.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Saccharomyces cerevisiae*; Planejamento Doehlert; Selênio

## OPTIMIZATION OF PARAMETERS FOR SELENIUM SUPPLEMENTED BEER PRODUCTION

### ABSTRACT

Selenium (Se) is considered a mineral essential to human health due to its antioxidant functions, as well as because its deficiency is related to the occurrence of various diseases in humans. *Saccharomyces cerevisiae* are the yeasts responsible for fermentation during the brewing process and have the ability to accumulate selenium and bioavailability in the protein form, which is more easily assimilated by the body. However, the capacity for accumulation is limited and high levels of selenium are toxic to humans. In this context, it is necessary to optimize fermentation parameters for the production of beer supplemented with selenium, which is the objective of this research. It was used the Response Surface Methodology, applying Doehlert Design 3x5, having as independent variables the temperature of fermentation and concentration of selenium (as  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ), and volumetric productivity in ethanol and apparent degree of fermentation as dependent variables. The yeasts SC52, SC57 and SC82, previously selected as good brewers (CHAPTER 2) were used. The fermentations carried out with yeasts SC52 and SC82 presented statistically significant results, and the fermentation parameters were optimized for beer production of 25.0° C and 11  $\text{mgL}^{-1}$  of Se and 23.5° C and 12  $\text{mgL}^{-1}$  of Se , Respectively. SC57 yeast did not present significant statistical results and was not indicated for the production of beer supplemented with selenium.

**KEY WORDS:** *Saccharomyces cerevisiae*; Planning Doehlert; Selenium

### 3.1 INTRODUÇÃO

O selênio é um mineral que desempenha funções antioxidantes, sendo um nutriente essencial para os animais e seres humanos (STOLZ *et al.*, 2006). A importância como elemento traço essencial para a saúde humana é reconhecida e a sua deficiência está diretamente correlacionada à ocorrência de várias doenças (PEDRERO & MADRID, 2009; LU & HOLMGREN, 2009; BOOSALIS, 2008; LATRECHE & CHAVATTE, 2008; RAYMAN, 2000).

Em várias regiões do mundo o teor de selênio na dieta foi estimado como sendo insuficiente para a correta atividade de proteção das selenoenzimas. Os primeiros relatos de doenças devido à deficiência de selênio na população humana ocorreram na China (TINGGI, 2003). A deficiência em selênio diminui a quantidade de selenoproteínas, alterando os processos biológicos mediados por estas, e impede a síntese e a função da GPX (glutathione-peroxidase). Os efeitos da deficiência de selênio são geralmente a cardiomiopatia reversível, conhecida como a doença de Keshan, infertilidade e artrite (PEDRERO & MADRID, 2009).

A partir do conhecimento das propriedades antioxidantes e preventivas do selênio contra o cancro, além de estudos “*in vitro*” demonstrarem ser um importante inibidor da replicação do vírus HIV, bem como melhorar a resposta imunológica a doenças relacionadas com este vírus como a herpes e cândida, há um grande interesse em desenvolver suplementos nutricionais enriquecidos com selênio (RAYMAN, 2012; NAVARRO-ALARCON & CABRERA-VIQUE, 2008; PONCE DE LEÓN *et al.*, 2002).

A levedura *S. cerevisiae* tem a capacidade de transformar o selênio inorgânico em compostos orgânicos e dependendo das condições de crescimento pode acumular elevadas quantidades de selênio (até 3000 mg kg<sup>-1</sup>) e transformá-lo em selenometionina (PÉREZ-CORONA *et al.*, 2011; PEDRERO & MADRID, 2009).

A produção de leveduras selenizadas é relativamente econômica e consegue-se mediante o enriquecimento com selenito de sódio, entretanto seu uso não se restringe à preparação de suplementos. Na região norte da Ucrânia utiliza-se como fermento para a fabricação de pão, em que o teor de selênio é equivalente a 25 % da DDR e é encontrado principalmente na forma de selenometionina (PEDRERO & MADRID, 2009).

A partir destas abordagens, Pérez-Corona *et. al.* (2011) avaliaram em escala laboratorial pela primeira vez a transformação do selenito pelas leveduras da espécie *S. cerevisiae* e *S. bayanus* durante a produção de vinho branco, concluindo que a produção de vinho branco por fermentação alcoólica é compatível com a presença de selênio inorgânico e independente da espécie utilizada, além vinho com selênio ser uma fonte adequada de selenometionina. No que se refere à cerveja, estes pesquisadores estudaram a biotransformação de selênio adicionado como selenito, por *S. cerevisiae* e *S. uvarum* para produção de cervejas tipo Ale e Lager, respectivamente, concluindo que a selenometionina foi o principal composto de selênio identificado tanto nas cervejas produzidas quanto nas leveduras, adotando como concentração máxima de selênio 20 mg L<sup>-1</sup>.

Ponce de Leon, *et. al.* (2002), estudando diferentes métodos de incorporação de selênio em *S. cerevisiae*, utilizou concentrações de selênio entre 10 e 50 mg L<sup>-1</sup> onde observaram que quanto maior a concentração de selênio adicionada maior a quantidade incorporada, entretanto também observaram uma diminuição no número de células viáveis além de não encontrarem variação de selenometionina, independente das concentrações de selênio incorporadas inicialmente.

Dependendo do tipo de levedura utilizada no processo as cervejas podem ser classificadas em dois tipos principais, *Ale* ou *Lager*, em que o processo fermentativo é realizado em diferentes temperaturas. As cervejas tipo *Ale* são consideradas de alta fermentação, pois fermentam em temperaturas entre 18 e 22 ° C e as cervejas tipo *Lager*, por fermentarem em temperaturas entre 7 e 15° C são consideradas de baixa fermentação (GONZALEZ, *et. al.*, 2008; LIBKIND, *et. al.*, 2011).

A temperatura de fermentação para uma mesma levedura também pode influenciar positiva ou negativamente na etapa fermentativa. A diminuição da temperatura de fermentação incorre em menores concentrações de células em suspensão, independente da concentração de extrato presente no mosto cervejeiro; e o aumento da temperatura favorece o consumo do extrato aparente (concentração aparente dos açúcares totais), diminuindo o tempo de fermentação (RAMIREZ & MACIEJOWSKI, 2007; CARVALHO, 2009; DRAGONE, 2002).

Considerando que a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, fermentada por ação de leveduras *Saccharomyces* sp., esta pesquisa objetiva otimizar os parâmetros temperatura de fermentação e concentração de selênio para a produção de cerveja suplementada.

## 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.2.1 SELÊNIO

Como fonte de selênio foi utilizado o sal selenito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ ) (Merck, Alemanha). As quantidades de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  utilizadas foram determinadas em função do selênio presente ( $2,19 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  contém  $1 \text{ g L}^{-1}$  de Se).

### 3.2.2 LEVEDURA

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na pesquisa (SC52, SC57 e SC82), foram isoladas e identificadas por SILVA (2009) e caracterizadas quanto a tolerância ao etanol, osmotolerância, termotolerância, produção de  $\text{H}_2\text{S}$  e capacidade de floculação por PINHEIRO (2012). Estas cepas foram selecionadas anteriormente (CAPÍTULO 2) como boas produtoras de cerveja considerando fatores como, Concentração Celular, Consumo de Extrato Aparente, Grau Aparente de Fermentação e Produção de Etanol; e estão preservadas em solução de glicerol 50% à  $80^\circ\text{C}$  no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – Bahia – Brasil e no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMA) da Agroindústria da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia – Brasil.

A partir da cultura estoque as cepas foram repicadas em 3 placas de petri contendo ágar Sabouraud e mantidas em estufa à  $30^\circ\text{C}$  por 24 h. Em seguida, os repiques foram transferidos por raspagem superficial do Ágar com uso de alça de platina e em condições assépticas em Cabine de Segurança Biológica (CSB) para um frasco erlenmeyer de 500 mL contendo 250 mL de mosto cervejeiro a  $12^\circ\text{P}$  ( $\pm 0,5^\circ\text{P}$ ) para iniciar a etapa de propagação. O frasco foi incubado a  $30^\circ\text{C}$  em agitador rotatório a 150 rpm por 24 h. A etapa de fermentação foi iniciada após verificar a concentração do inóculo no frasco. Utilizou-se o volume máximo

de 10% da propagação, necessário para atingir uma concentração celular entre  $1-2 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup> no início da fermentação.

### 3.2.3 MOSTO CERVEJEIRO

O mosto cervejeiro foi produzido com as seguintes matérias primas: água, do tipo mineral, obtida no comércio local do Município de Feira de Santana, Bahia; malte de cevada do tipo Pilsen, originário da Bélgica (fabricante Castle Malting), adquirido em empresas especializadas do setor cervejeiro, fornecido em sacos de 25 kg; e lúpulo, aromático e de amargor, da marca Hopsteiner (origem, E.U.A), adquiridos em empresas especializadas do setor, sendo o lúpulo aromático, em Pellets tipo 90, com aproximadamente 7% de ácidos alfa e o lúpulo de amargor, em Extrato CO<sub>2</sub>, com aproximadamente 30% de ácidos alfa.

O mosto cervejeiro foi preparado a partir das seguintes etapas: moagem do malte, mosturação (a rampa de mosturação é apresentada na Tabela 3.1), filtragem (separar o líquido da casca do malte), e fervura, quando foram adicionados os lúpulos (de amargor, após 15 min de iniciada a fervura e aromático à 15 min do final da fervura, em que o tempo total foi de 60 min). Após a fervura, o mosto cervejeiro foi resfriado e acondicionado em recipiente estéril com capacidade de 1 L e congelado para posterior utilização nos ensaios fermentativos.

Tabela 3.1: Rampa de mosturação com as respectivas temperaturas, tempos de ativação e enzimas ativadas

<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tempo (min)</b>	<b>Enzimas</b>
35	20	Hemicelulases
45	10	Exopeptidases
52	10	Endopeptidases
62	20	Dextrinases e beta-amilases
72	20	Alfa-amilases
76	10	Inativação

### 3.2.4 FERMENTAÇÃO

A fermentação foi iniciada após realizada a propagação em mosto cervejeiro com o objetivo de atingir o maior número de células viáveis. A concentração alcançada de células na propagação foi de  $1-2 \times 10^8$  cel mL<sup>-1</sup>, sendo utilizado para a fermentação 10% do volume da

propagação para obtenção de uma concentração celular no início da fermentação de  $1-2 \times 10^7$  cel mL<sup>-1</sup>.

O experimento foi conduzido em escala de bancada em erlenmeyer de 500 mL, sendo utilizado um volume útil de 250 mL dos quais 225 mL do mosto proveniente da fervura e 25 mL de mosto da propagação.

O selênio (na forma de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) foi adicionado no início da fermentação, em cinco concentrações: 5, 15, 25, 35 e 45 mg L<sup>-1</sup>; as temperaturas de fermentação foram de 10, 20 e 30° C. Os estudos foram realizados aplicando-se a matriz experimental proposta por Doehlert (1970).

A fermentação (Figura 3.1) foi dividida em duas etapas, fermentação primária e fermentação secundária. Foram utilizadas as cepas descritas no item 2.2, com tempo total da fermentação primária de 144 h e coletadas amostras a cada 12 h para análises de extrato aparente, densidade, etanol e grau aparente de fermentação.

Após a fermentação primária o fermentado obtido foi transferido para outro erlenmeyer de igual capacidade, evitando-se a transferência de leveduras, iniciando a etapa de fermentação secundária ou maturação, a qual foi realizada em temperatura de 0°C em incubadora shaker sem agitação por 144 h.

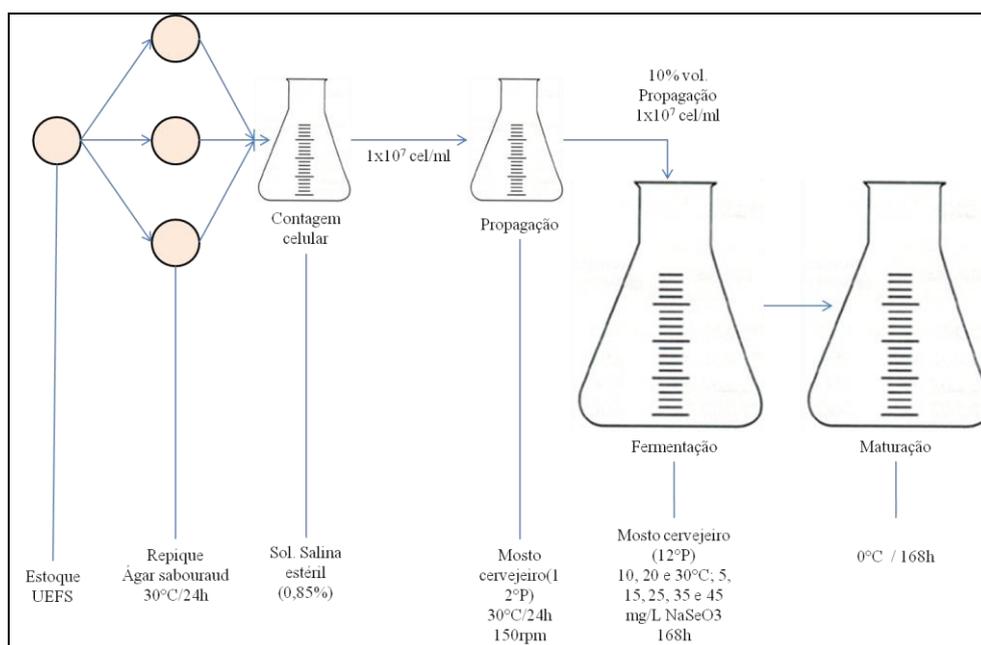


Figura 3.1 – Desenho esquemático da fermentação do mosto puro malte, com adição de selênio.

### 3.2.5 GRAU APARENTE DE FERMENTAÇÃO (GAF) E PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA EM ETANOL (QP)

As variáveis respostas escolhidas para o planejamento experimental foram Grau Aparente de Fermentação (GAF) e Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp). Para a mensuração as amostras foram degaseificadas por agitação vigorosa durante 1 min, em seguida centrifugadas a 5400 g por 10 min e o sobrenadante obtido foi injetado no equipamento analisador de cerveja - Beer Analyser *Anton Parr* (Áustria), para determinar o Grau Aparente de Fermentação (%), densidade ( $\text{g cm}^{-3}$ ) e o teor de etanol (% v v).

A Qp foi determinada de acordo metodologia proposta por Borzani (1986) e Moser (1988), *apud* Carvalho (2009), descrita na Eq. 3.1.

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \left( \frac{P - P_i}{t - t_i} \right) \quad \text{Eq. 3.1}$$

Onde:

Pi e P: Concentração inicial e no tempo t de etanol ( $\text{g L}^{-1}$ )

ti e t : Tempo inicial e tempo t de fermentação (h)

### 3.2.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Visando otimizar as variáveis do experimento para a seleção de leveduras e produção de cerveja suplementada com selênio optou-se pela aplicação do planejamento Doehlert (1970), utilizando como variáveis independentes temperatura de fermentação e concentração de selênio (na forma de selenito de sódio), e produtividade volumétrica em etanol e grau aparente de fermentação as variáveis dependentes.

O planejamento Doehlert analisa experimentos em segunda ordem e refere-se a esquematizações onde é possível se obter os valores de máximo ou mínimo experimental e se baseiam na metodologia de superfície de resposta. É uma ferramenta fundamentada na teoria estatística que fornece informações seguras sobre o processo, minimizando o empirismo que envolve técnicas de tentativa e erro (RODRIGUES & IEMMA, 2005).

Geralmente empregam funções polinomiais lineares ou quadráticas para descrever o sistema estudado, possibilitando explorar o sistema até sua otimização. As funções polinomiais comumente utilizadas são as lineares, onde é possível identificar a direção da ocorrência do fenômeno estudado, e as quadráticas, que permitem a observação do ponto máximo, em diferentes superfícies gráficas (RODRIGUES & IEMMA, 2005). Por meio da Eq. 3.2 pode-se estimar a resposta da função linear e na Eq. 3.3 é representado o modelo polinomial de uma função quadrática para duas variáveis.

$$Z = b_0 + b_1x_1 + b_2y_2 + \varepsilon \quad \text{Eq. 3.2}$$

$$Z = b_0 + b_1x + b_2y + b_{11}x^2 + b_{22}y^2 + b_{12}xy + \varepsilon \quad \text{Eq. 3.3}$$

Onde:

Z é a resposta;

$b_0, b_1, b_2, b_{11}, b_{22}, b_{12}$ , são estimativas do parâmetro do modelo;

x, y, são as variáveis codificadas; e

$\varepsilon$  refere-se ao erro experimental.

Este experimento foi conduzido utilizando um planejamento fatorial 3x5. A matriz de planejamento e os níveis utilizados são apresentados na Tabela 3.2. Foram utilizados cinco níveis de selênio e três níveis de temperatura, sendo os níveis de selênio estabelecidos a partir da pesquisa realizada por Ponce de Leon, et. al. (2002) e os níveis de temperatura escolhidos em função das temperaturas de fermentação dos principais estilos de cerveja (*lager e ale*).

A relação entre os valores reais e codificados é dada pela Eq. 3.4:

$$C_i = \{(x_i - x_i^o) / \Delta x_i\} \times \alpha \quad \text{Eq. 3.4}$$

Em que:

- $C_i$  é o valor codificado para o nível de fator de i,
- $x_i$  é a sua valor real em um experimento,
- $x_i^o$  é o valor real no centro do domínio experimental,

- $\Delta x_i$  é a variação entre os pontos experimentais e
- $\alpha$  é o limite de valor codificado para cada fator.

O número de experiências necessárias (N) é dado pela Eq. 3.5:

$$N = 2^k + k + C_o \quad \text{Eq. 3.5}$$

Onde:

- $k$  é o número de variáveis e
- $C_o$  é o número de pontos de centro.

Duas repetições no ponto central foram incluídas a fim de validar o modelo por meio de uma estimativa de variância experimental.

Tabela 3.2: Matriz de planejamento experimental Doehlert 3x5 com duas repetições do ponto central e respectivos níveis utilizados

Ensaio	Níveis reais		Níveis codificados	
	T (°C)	Se (mg L <sup>-1</sup> )	T	Se
1	20	25	0	0
2	20	45	0	+1
3	30	35	+0,866	0,5
4	20	5	0	-1
5	10	15	-0,866	-0,5
6	10	35	-0,866	0,5
7	30	15	+0,866	-0,5
8	20	25	0	0
9	20	25	0	0

T – Temperatura; Se – concentração de selênio utilizada.

### 3.2.7 SIGNIFICÂNCIA DOS EXPERIMENTOS

Para analisar a significância dos experimentos todos os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey, adotando-se o nível de significância de 5%. Foi utilizado o software STATISTICA versão 8.0.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados correspondentes ao esquema da matriz de planejamento e os níveis utilizados para fermentação com as leveduras SC52, SC57 e SC82 estão demonstrados na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Matriz de planejamento fatorial Doehlert 3x5 com duas repetições no ponto central, considerando as fermentações realizadas com as leveduras SC52, SC57 e SC82

Ensaio	Variáveis independentes				Variáveis dependentes					
	Níveis reais		Níveis Codificados		SC52		SC57		SC82	
	T (°C)	Se (mgL <sup>-1</sup> )	T	Se	GFA (%)	Qp (gL.h <sup>-1</sup> )	GFA (%)	Qp (gL.h <sup>-1</sup> )	GFA (%)	Qp (gL.h <sup>-1</sup> )
1	20	25	0	0	66,77	0,34	67,47	0,35	66,82	0,34
2	20	45	0	+1	40,56	0,20	55,20	0,26	36,35	0,20
3	30	35	+0,866	0,5	43,01	0,22	65,14	0,33	43,26	0,22
4	20	5	0	-1	67,23	0,34	67,99	0,35	67,65	0,37
5	10	15	-0,866	-0,5	50,33	0,25	43,72	0,23	54,89	0,30
6	10	35	-0,866	0,5	40,68	0,21	43,37	0,23	39,75	0,20
7	30	15	+0,866	-0,5	61,02	0,31	64,89	0,32	59,62	0,32
8	20	25	0	0	65,81	0,33	67,16	0,35	66,85	0,35
9	20	25	0	0	66,65	0,34	67,77	0,35	66,87	0,35

T – Temperatura; Se – concentração de selênio utilizada; GFA – Grau Aparente de Fermentação; Qp – Produtividade Volumétrica em Etanol

#### 3.3.1 GRAU APARENTE DE FERMENTAÇÃO

Uma atenuação aparente superior a 50% é considerada satisfatória em processos de produção de cerveja (HENDGES, 2014; MANZANO, *et. al.*, 2005). Nesta pesquisa o Grau Aparente de Fermentação (GAF) variou entre 40,56% (ensaio 2) e 67,23% (ensaio 4) para o experimento realizado com a levedura SC52; entre 43,37% (ensaio 6) e 67,99% (ensaio 4) para a levedura SC57; e entre 36,35% (ensaio 2) e 67,65% (ensaio 4) para a levedura SC82. Os três experimentos realizados nos pontos centrais (ensaios 1, 8 e 9) apresentaram uma variação pequena, indicando boa repetibilidade.

A análise da variância, ANOVA dos resultados do delineamento Doehlert são apresentados nas Tabelas 3.4, 3.5 e 3.6, onde se observa o valor R<sup>2</sup> de 0,9983, o que representa 99,83% da variância para a levedura SC52; 0,91477 para a levedura SC57, que explica 91,48% da variância; e 0,9999 para a levedura SC82, explicando 99,99% da variância.

Tabela 3.4: Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC52 e variável resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA)

<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tab</sub>*</b>
Regressão	1244,401	5	248,8802	1051,606	9,013
Resíduo	0,71	3	0,236667		
Falta de Ajuste	0,163	1	0,163	0,595978	18,513
Erro puro	0,547	2	0,2735		
Total	1245,821	8	155,7276		

\* Distribuição F de Fischer-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade.  $R^2 = 0,99938$ ;  $R^2$  ajustado = 0,99835

Tabela 3.5: Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC57 e variável resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA)

<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tab</sub>*</b>
Regressão	850,249	5	170,05	18,8823	9,013
Resíduo	27,0174	3	9,0058		
Falta de Ajuste	26,8343	1	26,8343	293,111	18,513
Erro puro	0,1831	2	0,09155		
Total	904,284	8	113,036		

\* Distribuição F de Fischer-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade.  $R^2 = 0,96804$ ;  $R^2$  ajustado = 0,91477

Tabela 3.6: Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC52 e variável resposta Grau Aparente de Fermentação (GFA)

<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tab</sub>*</b>
Regressão	1423,38	5	284,676	106754	9,013
Resíduo	0,008	3	0,00267		
Falta de Ajuste	0,007	1	0,007	14	18,513
Erro puro	0,001	2	0,0005		
Total	1423,4	8	177,925		

\* Distribuição F de Fischer-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade.  $R^2 = 0,99999$ ;  $R^2$  ajustado = 0,99998

Para as leveduras SC52 e SC82, o teste F indica que o experimento é significativo ao nível de 5% de significância e que o modelo obtido para a predição do Grau Aparente de Fermentação em função das variáveis significativas (Eq. 3.6 e 3.8, respectivamente) pode ser utilizado dentro das faixas de temperatura e concentração de selênio (na forma de selenito de sódio) estudadas. Para a levedura SC57 o teste F indica significância ao nível de 5%, exceto para a interação linear entre as variáveis Temperatura e Se. Porém, a maior parte da significância está associada à Falta de Ajuste e não ao Erro Puro. Entretanto, o modelo não é inviabilizado, pois a equação apresentou também um  $R^2$  alto (0,91477). O modelo obtido para a predição do Grau Aparente de Fermentação para a levedura SC57 em função das variáveis significativas é apresentado na Eq. 3.7.

$$Z = -11,31 + 1,31x + 6,66y - 0,03x^2 - 0,14y^2 - 0,02xy + 0 \quad \text{Eq. 3.6}$$

$$Z = -3,95 + 0,49x + 5,72y - 0,02x^2 - 0,12y^2 + 0 \quad \text{Eq. 3.7}$$

$$Z = 2,59 + 1,13x + 5,78y - 0,04x^2 - 0,14y^2 - 0,003xy + 0 \quad \text{Eq. 3.8}$$

Onde:

Z – Grau Aparente de Fermentação (GAF), %;

x – Concentração de selênio, mg L<sup>-1</sup>; e

y – Temperatura de fermentação (T), °C.

Uma melhor visualização da influência das variáveis (T e Se) no GAF pode ser feita através do Diagrama de Pareto. Seguindo as barras horizontais de cima para baixo, o resultado nos mostra valores positivos da figura que representa o aumento do valor do Grau Aparente de Fermentação e os valores negativos o inverso. Na Figura 3.2 são apresentados os Diagramas de Pareto para as leveduras SC52, SC57 e SC82 em que se observam todas as interações avaliadas como significativas ao nível de 5%.

O único valor positivo observado no Diagrama de Pareto para todas as leveduras refere-se ao modelo linear da variável temperatura, o que está coerente, pois o aumento da temperatura favorece o consumo do extrato aparente (concentração aparente dos açúcares totais) e conseqüentemente o GAF, diminuindo, desta forma, o tempo de fermentação (CARVALHO, 2009; RAMIREZ & MACIEJOWSKI, 2007).

Com o objetivo de encontrar a região ótima dentro do domínio experimental, através da matriz de Doehlert, foi construída a curva de contorno e a superfície de resposta (Figura 3.3), as quais apresentam a interação entre as variáveis Se e Temperatura e suas influências no Grau Aparente de Fermentação. De acordo com o máximo da concordância obtido na Figura 3.3, isto é, a região representada pela cor mais escura, os valores ótimos obtidos foram de 11 mg L<sup>-1</sup> (Se) e 25,0 °C (Temperatura) para a levedura SC52, 23 mg L<sup>-1</sup> (Se) e 28,0 °C (Temperatura) para a levedura SC57 e 12 mg L<sup>-1</sup> (Se) e 23,5 °C (Temperatura) para a levedura SC82. Portanto, estes são os pontos mais indicados para se obter o valor mais significativo do Grau Aparente de Fermentação para cada uma das leveduras estudadas.

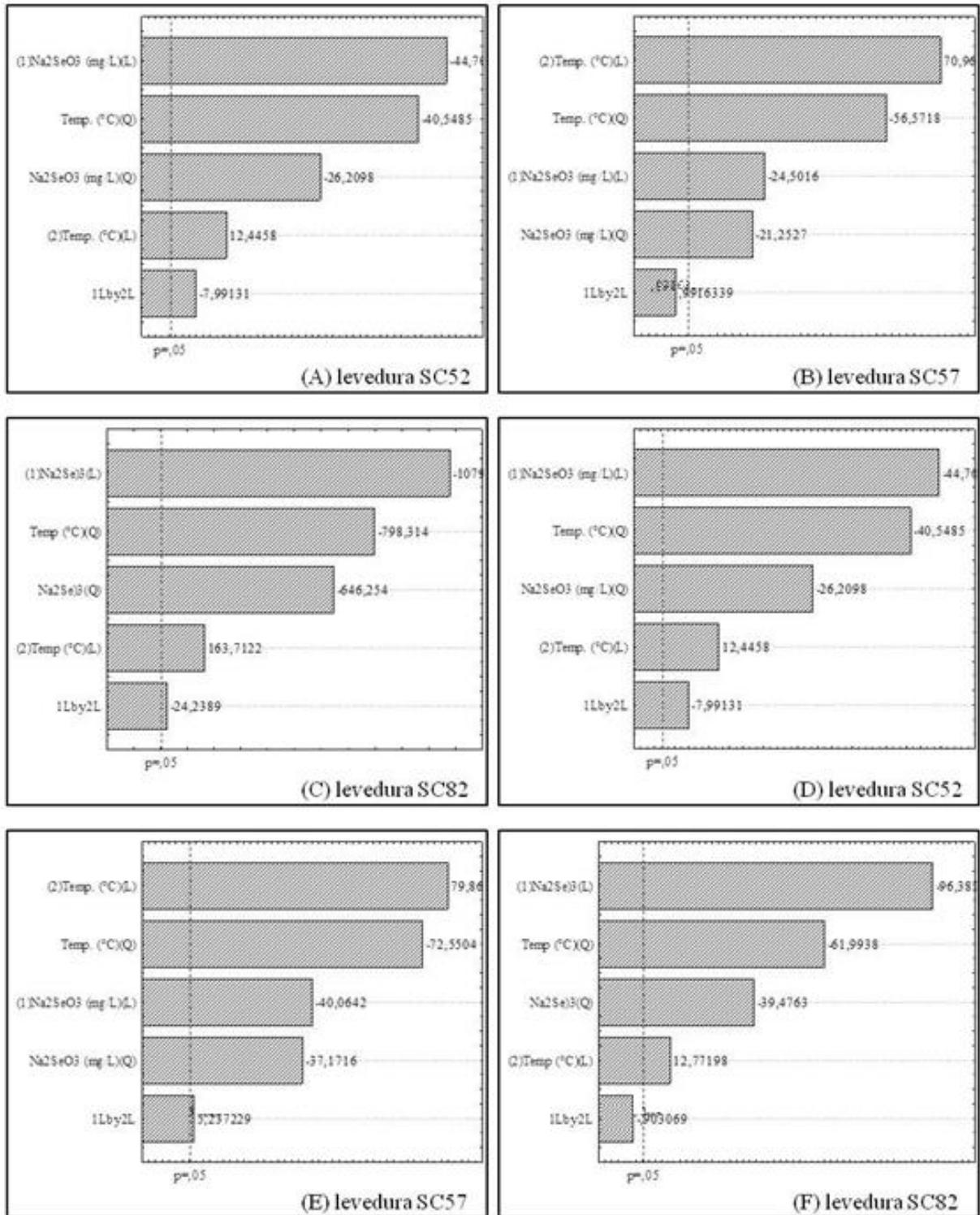


Figura 3.2 – Diagrama de Pareto das interações das variáveis Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> e Temperatura para os fatores/respostas Grau Aparente de Fermentação (A, B e C) e Produtividade Volumétrica em Etanol (D, E e F).

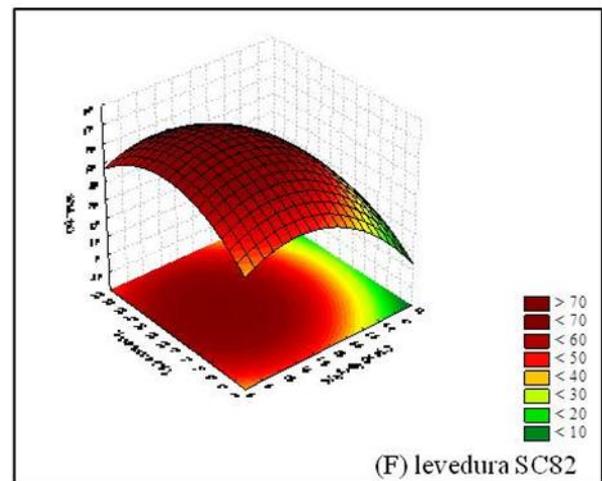
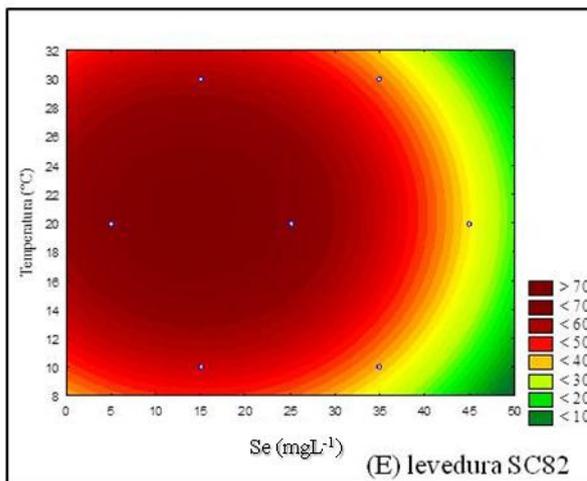
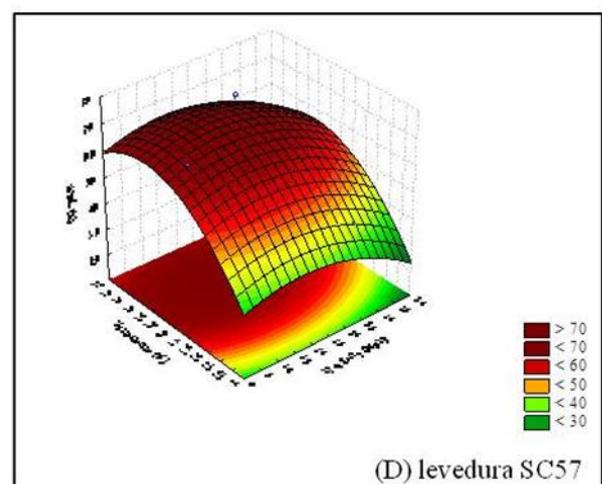
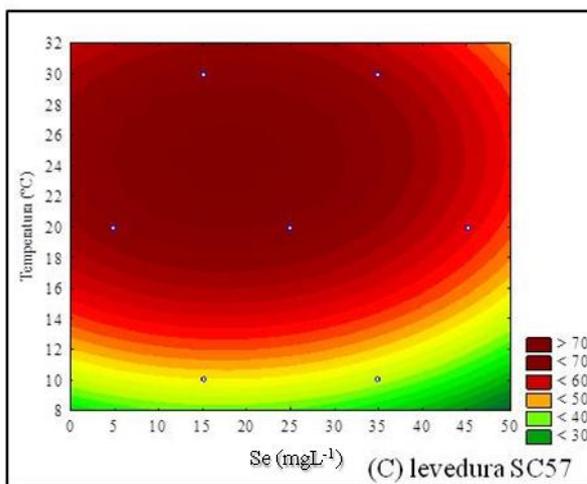
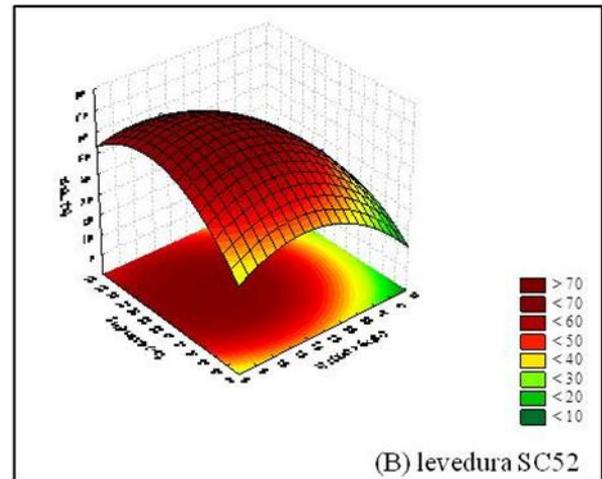
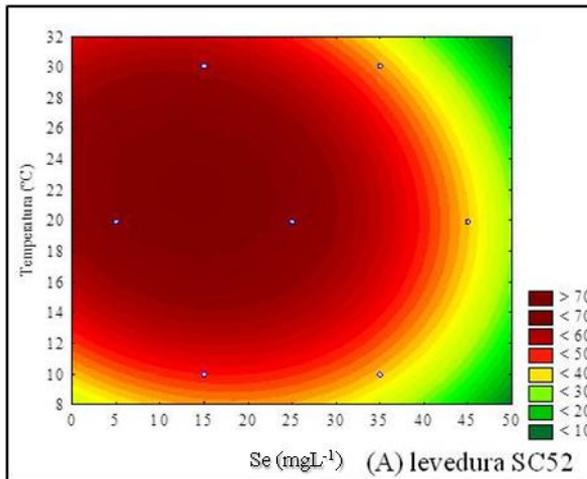


Figura 3.3 – Curvas de contorno (A, C e E) e Superfície de resposta (B, D e F) referente à variável resposta Grau Aparente de Fermentação para a levedura SC52, SC57 e SC82.

### 3.3.2 PRODUTIVIDADE VOLUMÉTRICA EM ETANOL (Qp)

A Qp variou entre 0,20 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (ensaio 2) e 0,34 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (ensaios 1, 4 e 9) para o experimento conduzido com a levedura SC52, entre 0,23 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (ensaios 5 e 6) e 0,35 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (ensaios 1, 4, 8 e 9) para o experimento com a levedura SC57 e entre 0,20 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (ensaio 2) e 0,37 gL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup> (ensaio 4) para o experimento com a levedura SC82. A variação nos ensaios no ponto central foi mínima indicando uma boa repetibilidade dos experimentos.

A análise da variância entre as interações das variáveis, dos resultados do delineamento Doehlert são apresentados nas Tabelas 3.7, 3.8 e 3.9, onde observa-se o valor R<sup>2</sup> = 0,9983 para levedura SC52 (Tabela 3.7), R<sup>2</sup> = 0,8453 para a levedura SC57 (Tabela 3.8) e para a levedura SC82 o R<sup>2</sup> = 0,9963 (Tabela 3.9).

Tabela 3.7: Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC52 e variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)

<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tab</sub>*</b>
Regressão	0,032484	5	0,0064968	1082,8	9,013
Resíduo	0,000018	3	0,000006		
Falta de Ajuste	0,000004	1	0,000004	0,57143	18,513
Erro puro	0,000014	2	0,000007		
Total	0,032520	8	0,004065		

\* Distribuição F de Fischer-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade. R<sup>2</sup> = 0,99938; R<sup>2</sup> ajustado = 0,99835

Tabela 3.8: Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC57 e variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)

<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tab</sub>*</b>
Regressão	0,023101	5	0,0046202	10,336	9,013
Resíduo	0,001341	3	0,000447		
Falta de Ajuste	0,001338	1	0,001338	892	18,513
Erro puro	0,000003	2	0,0000015		
Total	0,025783	8	0,00322288		

\* Distribuição F de Fischer-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade. R<sup>2</sup> = 0,94198; R<sup>2</sup> ajustado = 0,84527

Tabela 3.9: Análise de variância para o experimento realizado com a levedura SC82 e variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp)

<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>F<sub>tab</sub>*</b>
Regressão	0,038738	5	0,0077476	455,741	9,013
Resíduo	0,000051	3	0,000017		
Falta de Ajuste	0,000046	1	0,000046	18,4	18,513
Erro puro	0,000005	2	0,0000025		
Total	0,03884	8	0,004855		

\* Distribuição F de Fischer-Snedecor ao nível de 5% de probabilidade. R<sup>2</sup> = 0,9986; R<sup>2</sup> ajustado = 0,99962

O teste F indica que os experimentos são significativos ao nível de 5%, entretanto para a levedura SC57 a falta de ajuste foi significativa, indicando que a maior parte da significância está atribuída à falta de ajuste e não ao erro puro. Os modelos obtidos para representar o comportamento da variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol, nos experimentos realizados com as leveduras SC52, SC57 e SC82, são apresentados nas Eq. 3.9, 3.10 e 3.11, respectivamente.

$$Z = -0,06046 + 0,00668x + 0,03401y - 0,00016x^2 - 0,00074y^2 - 0,00011xy + 0 \text{ Eq. 3.9}$$

$$Z = -0,0123 + 0,0032x + 0,0291y - 0,0001x^2 - 0,0006y^2 + 0,00003xy + 0 \text{ Eq. 3.10}$$

$$Z = 0,06771 + 0,00293x - 0,02863y - 0,00014x^2 - 0,00068y^2 - 0,00001xy + 0 \text{ Eq. 3.11}$$

Onde:

Z – Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp), g L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>;

x – Concentração de selênio, mg L<sup>-1</sup>; e

y – Temperatura de fermentação (T), °C.

No Diagrama de Pareto (Figura 3.2) é possível visualizar melhor as interações entre as variáveis. Observa-se que para as leveduras SC52 (Figura 3.2-D) e SC57 (Figura 3.2-E) todas as interações foram significativas, sendo a interação linear da variável Se e a interação linear da variável Temperatura as mais significativas, respectivamente. Para a levedura SC82 (Figura 3.2-F) a interação linear entre as variáveis não foi significativa. Em todos os experimentos realizados ficou evidenciado que a variável temperatura exerce influência positiva na Qp, evidenciando que o aumento da temperatura de fermentação proporciona um aumento da produtividade volumétrica. Dragone, *et. al.* (2003), Brigs, *et. al.* (2004) e Carvalho (2009) em seus trabalhos também verificaram esta correlação positiva entre Temperatura e Qp.

A região ótima dentro do domínio experimental, através da matriz de Doehlert, é apresentada por meio das Curvas de Contorno e da Superfície de Resposta (Figura 3.4). O máximo da concordância obtido apresenta os valores ótimos de 11 mg L<sup>-1</sup> de Se e 25,0 °C de Temperatura para a levedura SC52, 23 mg L<sup>-1</sup> de Se e 28 °C de Temperatura para a levedura

SC57 e  $12 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  e  $23,5 \text{ }^\circ\text{C}$  de Temperatura para a levedura SC82, sendo estes os pontos mais indicados para se obter o valor mais significativo da  $Q_p$ .

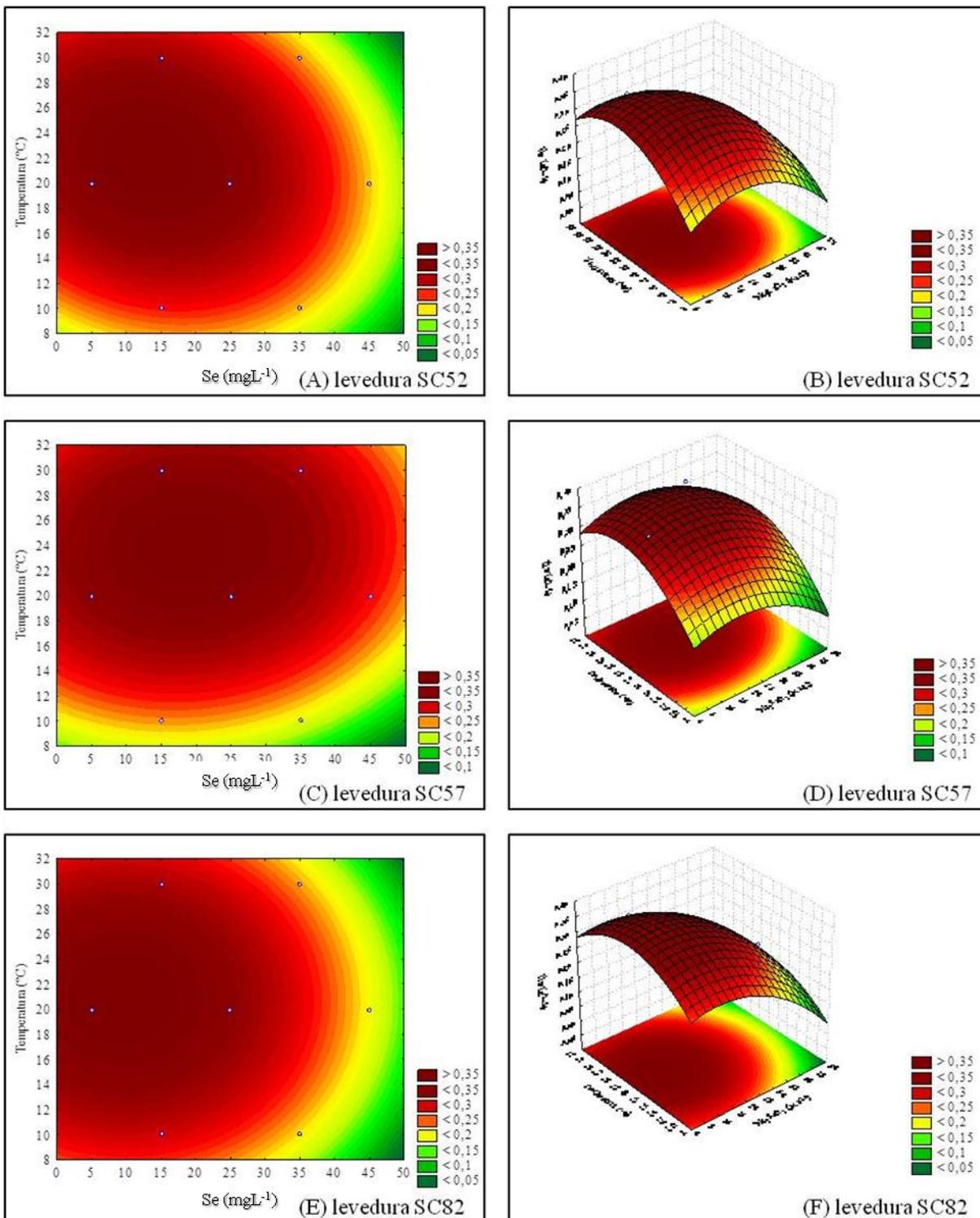


Figura 3.4 – Curvas de contorno (A, C e E) e Superfície de resposta (B, D e F) referente à variável resposta Produtividade Volumétrica em Etanol para as leveduras SC52, SC57 e SC82.

### 3.3.3 VALIDAÇÃO DOS MODELOS

Para a validação dos modelos obtidos foram realizadas fermentações com as leveduras SC52 e SC82 nas condições do ponto otimizado obtido para o GAF e para a Qp e mais duas novas condições de fermentação. Foi realizada uma comparação com os resultados obtidos no planejamento e com os resultados teóricos obtidos através dos modelos matemáticos. As Tabelas 3.10 e 3.11 apresentam as condições de fermentação e os resultados obtidos onde é possível verificar que os valores experimentais observados tanto para o GAF assim como para a Qp encontram-se próximos aos previstos pelos modelos propostos.

Para a levedura SC52 o erro padrão variou entre 0,47% e 0,62% para o GAF e de 0,08% a 0,49% para a Qp. Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que os modelos propostos para o GFA e a Qp podem ser aplicados para a predição das variáveis.

Tabela 3.10: Teste de validade dos modelos empíricos propostos para as variáveis resposta Grau Aparente de Fermentação (GAF) e Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp), para a levedura SC52

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes					
	Temp. (°C)	Se (mgL <sup>-1</sup> )	GAF			Qp		
			Observado (%)	Predito (%)	Erro padrão (%)	Observado (g Lh <sup>-1</sup> )	Predito (g Lh <sup>-1</sup> )	Erro padrão (%)
1	22,0	7	72,05	72,07	0,62	0,35	0,35	0,42
2	25,0	11	72,94	72,97	0,47	0,35	0,35	0,08
3	26,5	15	71,83	71,82	0,62	0,34	0,34	0,49

Tabela 3.11: Teste de validade dos modelos empíricos propostos para as variáveis resposta Grau Aparente de Fermentação (GAF) e Produtividade Volumétrica em Etanol (Qp), para a levedura SC82

Ensaio	Variáveis independentes		Variáveis dependentes					
	Temp. (°C)	Se (mgL <sup>-1</sup> )	GAF			Qp		
			Observado (%)	Predito (%)	Erro padrão (%)	Observado (g Lh <sup>-1</sup> )	Predito (g Lh <sup>-1</sup> )	Erro padrão (%)
1	22,0	7	68,94	68,91	0,94	0,38	0,38	0,05
2	23,5	12	69,97	69,94	1,31	0,38	0,38	0,02
3	25,0	17	68,58	68,46	3,39	0,36	0,36	0,00

Para a levedura SC82 a interação linear entre as variáveis não foi significativa, assim a equação proposta para fator resposta Qp foi ajustada para a Eq. 3.12. Foi realizada uma comparação com os resultados obtidos no planejamento e com os resultados preditos por meio dos modelos matemáticos. O erro padrão variou entre 0,94% e 3,39% para o GFA e de 0,00%

a 0,05% para a  $Q_p$ . Os resultados indicam que os modelos propostos para prever o GFA e a  $Q_p$  são coerentes, podendo assim ser utilizados para a predição destas respostas.

$$Z = 0,06771 + 0,00293x + 0,02863y - 0,00014x^2 - 0,00068y^2 + 0 \quad \text{Eq. 3.12}$$

Onde:

Z – Grau Aparente de Fermentação (GFA), %;

x – Concentração de selênio, mg/L; e

y – Temperatura de fermentação (T), °C.

Devido a falta de ajuste dos modelos obtidos para as duas variáveis em estudo (GAF e  $Q_p$ ) ter se apresentado significativa, optou-se por não realizar os testes de validação dos modelos propostos para a levedura SC57, a qual foi excluída para produção de cerveja artesanal suplementada com selênio em estudos posteriores.

### 3.4. CONCLUSÕES

O planejamento fatorial Doehlert como metodologia de Superfície de Respostas é de grande utilidade, permitindo modelar parâmetros para selecionar leveduras para a produção de cerveja suplementada com selênio;

Das três leveduras avaliadas, SC52 e SC82 apresentaram-se como potenciais para a produção de cerveja suplementada com selênio, sendo os pontos otimizados para a etapa fermentativa 25,0 °C de temperatura e 11 mg L<sup>-1</sup> de Se e 23,5 °C de temperatura e 12 mg L<sup>-1</sup> de Se, respectivamente. Devido à falta de ajuste nos modelos obtidos a levedura SC57 não foi selecionada para a produção de cerveja suplementada.

### 3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOOSALIS, M. G. The role of selenium in chronic disease. *Nutrition in Clinical Practice*. 23 (2008) 152-60.
- BRIGGS, D. E.; BOLTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. *Brewing: Science and Practice*. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.
- CARVALHO, G. B. M. *Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante*. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Eng. de Lorena da USP. São Paulo, 2009.
- DOEHLERT, D. H. Uniform shell designs. *Applied Statistics*, v. 19, n. 3, p. 231-239, 1970.
- DRAGONE, G. *Estudo cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados*. 2002. 111p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, Lorena, 2002.
- DRAGONE, G.; ALMEIDA E SILVA, JB. Cerveja. In: Venturini Filho, G. W. *Bebidas Alcoólicas – Ciência e Tecnologia*, pp.15-50. Edgar Blucher Ltda. 1ª edição. Vol.1. Brasil, 2010.
- GONZALEZ, S. S.; BARRIO, E.; QUEIROL, A. Molecular Characterization of New Natural Hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in Brewing. *Applied Environmental and Microbiology*, 74 (2008), pp. 2314-2320.
- HENDGES, D. H. *Produção de cervejas com teor reduzido de etanol, contendo quinoa malteada como adjunto*. 2014. 93p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Escola de Engenharia de Lorena. Lorena-SP, 2014.
- LATRECHE, L.; CHAVATTE, L. "Selenium incorporation into selenoproteins, implications in human health." *10th International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine*, Bastia, France. 2008.
- LIBKIND, D.; HITTNGER, C.; VALERIO, E.; GONÇALVES, C.; DOVER, J.; JOHNSTON, M.; GONÇALVES, P.; SAMPAIO, J. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108 (2011), pp. 14539-14544.
- LU, I; HOLMGREN, A. Selenoproteins. *The Journal of Biological Chemistry*. 284 (2009) 723-27.
- MANZANO, M.; GIUSTO, C.; BARTOLOMEOLI, I.; COMI, G. Microbiological Analyses of Dry and Slurry Yeasts for Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 111 (2005), pp. 203–208.
- NAVARRO-ALARCON, M.; CABRERA-VIQUE, C. Selenium in food and the human body: A review. *Sci Total Environ.*, v. 400, n. 1-3, p. 115-141, Aug 2008.
- PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 634 p. 135–152, 2009.

PÉREZ-CORONA, M. T.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, M.; VALDERRAMA, M. J.; RODRÍGUEZ, M. E.; CÁMARA, C.; MADRID, Y. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: Laboratory-scale experiments. *Food Chemistry*. v. 124, n. 3. p. 1050-1055. Feb 2011.

PINHEIRO, C. S. R. *Seleção de leveduras produtoras de etanol como suporte para a produção de álcool combustível e cachaça artesanal por produtores rurais*. 2012. 94p. Tese de Doutorado (Doutor em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2012.

PONCE DE LEÓN, C. A.; BAYON, M. M.; PAQUIN, C; CARUSO, J. A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. *Journal Applied Microbiology*. 92(4):602-10. 2002.

RAMIREZ, W. F.; MACIEJOWSKI, J. Optimal Beer Fermentation. *Journal of The Institute of Brewing*, 113(2007), pp. 325–333.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. *The Lancet*. v. 379, p. 1256-1268. Apr, 2012.

RAYMAN, M. P. The importance of selenium to human health. *The Lancet*. v. 356, n. 9225, p. 233-241, Jul 2000.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F.; *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*, Casa do Pão: São Paulo, 2005.

SILVA, A. F. *Caracterização genética de linhagens de Saccharomyces cerevisiae isoladas de fermentações artesanais de cachaças da Bahia*. 2009. 117p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2009.

STOLZ, J. F.; BASU, P; SANTINI, J. M.; OREMLAND, R. S. Arsenic and Selenium in Microbial Metabolism. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 60: 107-130. 2006.

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. *Toxicology Letters*. 137 p. 2003.

## **CAPÍTULO 4**

### **CERVEJA ARTESANAL SUPLEMENTADA COM SELÊNIO: SELÊNIO TOTAL E BIOESPECIAÇÃO**

## CERVEJA ARTESANAL SUPLEMENTADA COM SELÊNIO: SELÊNIO TOTAL E BIOESPECIAÇÃO

### RESUMO

O selênio é considerado um mineral essencial e sua deficiência tem sido relacionada com a ocorrência de algumas enfermidades. Leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, fundamentais para a produção de cerveja, têm demonstrado grande capacidade em acumular e transformar selênio inorgânico em compostos orgânicos. Este trabalho teve por objetivo produzir cervejas artesanais suplementadas com selênio e determinar a ocorrência e concentração de espécies orgânicas. Foram produzidas duas cervejas artesanais utilizando leveduras selecionadas com a suplementação por adição de  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ . Os parâmetros fermentativos variaram em função da cerveja produzida, sendo a temperatura e concentração de selênio: 25,0 °C e 11,0  $\text{mgL}^{-1}$ ; e 23,5 °C e 12,0  $\text{mgL}^{-1}$ , para CSeSC52 e CSeSC82, respectivamente. O teor de selênio total foi de 88,0  $\mu\text{gL}^{-1}$  e 73,0  $\mu\text{gL}^{-1}$  para as cervejas CSeSC52 e CSeSC82, respectivamente. Selenocompostos produzidos foram avaliados nas leveduras e nas cervejas utilizando metodologia analítica baseada em HPLC-ICP-MS, em que o principal composto identificado foi a selenometionina em ambas as cervejas e leveduras. Nas leveduras foram obtidas as maiores concentrações de Se, de 10,887  $\text{mgL}^{-1}$  na SC52 e 11,901  $\text{mgL}^{-1}$  na SC82. Não foi identificado  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  nas amostras de cerveja e levedura, denotando que esta espécie foi totalmente bioconvertida em organo-compostos de Se.

**PALAVRAS-CHAVE:** cerveja; biotransformação; selênio

## **CRAFT BEER SUPPLEMENTED WITH SELENIUM: TOTAL SELENIUM AND BIOESPECIATION**

### **ABSTRACT**

Selenium is considered an essential mineral and its deficiency has been related to the occurrence of some diseases. *Saccharomyces cerevisiae* yeasts, which are fundamental for brewing, have been shown to be capable of accumulating and transforming inorganic selenium into organic compounds. The objective of this work was to produce craft beers supplemented with selenium and to determine the occurrence and concentration of organic species. Two craft beers were produced using selected yeast supplemented with  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  addition. The fermentation parameters varied according to the beer produced, being the temperature and concentration of selenium:  $25.0^\circ\text{C}$  and  $11.0\text{ mgL}^{-1}$ ; and  $23.5^\circ\text{C}$  and  $12.0\text{ mgL}^{-1}$ , for CSeSC52 and CSeSC82, respectively. The total selenium content was  $88.0\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$  and  $73.0\text{ }\mu\text{gL}^{-1}$  for beers CSeSC52 and CSeSC82, respectively. Selenocompounds produced were evaluated in yeasts and beers using analytical methodology based on HPLC-ICP-MS, in which the main compound identified was selenomethionine in both beers and yeasts. In the yeasts, the highest concentrations of Se,  $10.887\text{ mgL}^{-1}$  in SC52 and  $11.901\text{ mgL}^{-1}$  in SC82 were obtained.  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  was not identified in the beer and yeast samples, denoting that this species was totally bioconverted in organo-compounds of Se.

**KEYWORDS:** beer; speciation; selenium

## 4.1 INTRODUÇÃO

O Selênio (Se) é um elemento essencial para a saúde humana e tem sido reportado na literatura como antioxidante (PEDRERO & MADRID, 2009), com propriedades anticancerígenas (COMBS JR. & COMBS, 1986), exercendo papel na prevenção de doenças cardíacas (NEVÉ, 1996), importante na fertilidade dos homens (BEHNE, *et. al.*, 1996; OLDEREID *et. al.*, 1998), bem como exercendo papel como inibidor do vírus replicador da AIDS (BECK, 2001; BAUM, *et. al.*, 2001). Entretanto, o conteúdo de selênio na população tem sido estimado como insuficiente (PEDRERO & MADRID, 2009), o que justifica o desenvolvimento de novos produtos, alimentos ou bebidas, suplementados com este mineral.

A principal fonte disponível de selênio para o consumo humano são as plantas que ao incorporar o Se residual do solo substitui o S (enxofre) da metionina convertendo em selenometionina (SeMet), que é considerada a forma mais adequada de absorção e retenção de Se. A SeMet pode ser responsável por >50% do teor de Se total da planta e é o principal precursor para a síntese de selenocisteína (SeCys), a forma mais abundante em produtos de origem animal (TAPIERO, *et. al.*, 2003).

A cerveja é considerada a bebida alcoólica mais consumida no mundo. No Brasil a produção atual é de 14 bilhões de litros, ocupando a 3ª colocação no mundo, perdendo apenas para China e Estados Unidos. O consumo per capita é de 66,9 litros/hab/ano, que representa apenas a 27ª posição no ranking que tem a República Tcheca liderando com 147,1 litros/hab/ano (CERVBRASIL, 2015). Os ingredientes básicos para a sua produção são: água, malte de cevada e lúpulo, e é fermentada e carbonatada por ação de leveduras do gênero *Saccharomyces* que classificam as cervejas em dois tipos principais: *Lager*, mais conhecidas e consumidas mundialmente, onde são utilizadas leveduras de baixa fermentação da espécie *Saccharomyces uvarum* e *Ale*, em que se utilizam leveduras de alta fermentação da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (CARVALHO, *et. al.*, 2006).

A produção de cerveja suplementada com selênio constitui ação inovadora, pois o único estudo reportado na literatura acerca desta possibilidade ocorreu em escala laboratorial com objetivo de desenvolvimento de metodologia analítica baseada no uso de HPLC-ICP-MS para avaliar a biotransformação de selênio adicionado como selenito de sódio durante o processo de fabricação de cerveja (MARTÍNEZ, *et. al.*, 2012).

Neste contexto, o objetivo desta pesquisa é produzir cerveja suplementada com selênio em escala de microcervejaria, permitindo a avaliação de parâmetros fermentativos do processo, bem como quantificar o selênio total e espécies de selênio presentes na levedura e na cerveja produzida.

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 INSTRUMENTAÇÃO**

A cerveja foi produzida na Microcervejaria da UESC, equipada com moinho de rolos, tanque de mosturação, tanque de filtração, tanque de fervura, sistema de refrigeração completo e tanques de fermentação e maturação, com capacidade produtiva de 750 L. Todos os equipamentos são do fabricante Egisa (RS, Brasil). Foram produzidos 100 L de cada cerveja no experimento.

A concentração celular foi determinada usando uma câmara de contagem Neubauer (Profondeur, Inglaterra) de dimensões 0,100 mm de profundidade e 0,0025 mm<sup>2</sup> e um microscópio (Nikon, Japão) modelo 71622, 1,25x.

O acompanhamento analítico da fermentação foi realizado a partir dos dados de etanol, densidade, extrato aparente e grau aparente de fermentação, sendo estes determinados em equipamento analisador de cerveja Beer Analyser (Anton Parr, Áustria). A manipulação das leveduras foi realizada em condições assépticas, em Cabine de Segurança Biológica Classe II (ESCO, Cingapura). A reativação e propagação foi realizada em incubadora shaker (ACB LABOR, Brasil). Todos os materiais (vidrarias, alças de platina, etc) foram devidamente autoclavados a 120 °C por 15 min.

A hidrólise enzimática das amostras foi realizada em incubadora shaker (ACB LABOR, Brasil). Os extratos foram centrifugados em centrífuga (Eppendorf 5804 F34-6-38, Alemanha). Digestão ácida foi realizada em HPA-S - High Pressure Ascher (Anton Parr, Áustria), sendo as condições e parâmetros apresentados na Tabela 4.1.

A hifenção HPLC-ICP-MS foi realizada utilizando um CTO-10AS (Shimadzu, Japão), bomba de alta pressão (Shimadzu, Japão) para separação cromatográfica e um NexION 300X ICP-MS para a detecção elementar específica. Separação de compostos de selênio de troca aniônica foi realizada numa Hamilton PRP-X100 (Reno, NE). A coluna

HPLC foi acoplada diretamente ao nebulizador Meinhard do ICP-MS com PTFE (0,5 mm de diâmetro interno). O sistema de injeção das amostras foi do tipo manual com válvula de uma via, equipado com um loop de 10  $\mu\text{L}$ . As condições do sistema hifenado e parâmetros cromatográficos estão resumidos na Tabela 4.2.

As medições de DRC-ICP-MS foram realizadas utilizando um CTO-10AS (Shimadzu, Japão) Além disso, a bomba de alta pressão (Shimadzu, Japão) para separação cromatográfica e um NexION 300X ICP-MS para a detecção elementar específica. As condições operacionais estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.1: Programa de decomposição do sistema HPA-S

Etapa	Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ )	Rampa (min)	Tempo (min)
1	70	0	0
2	120	20	0
3	240	0	60

Tabela 4.2: ICP-MS – Configurações instrumentais e condições de separação HPLC.

<b>ICP-MS parâmetros instrumentais</b>	
RF Power (W)	1350
Gás de plasma ( $\text{L min}^{-1}$ )	15,0
Gás auxiliar ( $\text{L min}^{-1}$ )	1,1
Gás nebulizador ( $\text{L min}^{-1}$ )	0,92-0,96
Cones	Pt
Modo de digitação	Peak-hopping
Taxa de fluxo do gás $\text{CH}_4$ ( $\text{mL min}^{-1}$ )	0,9
Rpq	0,45
Rpa	0
<b>Condições de HPLC</b>	
Coluna analítica	Hamilton PRP-X100 (250 x 4,1 mm)
Fase móvel	Ácido cítrico 10 mM, pH 5
Fluxo	1 $\text{mL min}^{-1}$
Volume de Injeção	10 $\mu\text{L}$

Tabela 4.3: Condições operacionais do ICP-MS

<b>Parâmetro</b>	<b>DRC II</b>
Potência RF (W)	1350
Gás de plasma (L min <sup>-1</sup> )	15
Gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	1,1
Gás nebulizador (L min <sup>-1</sup> )	0,92-0,96
Cones	Pt
Modo de digitação	Peak-hopping
Varredura/Leitura	5
Leituras/replicata	1
Replicatas	7
Tempo de permanência (ms)	50
Operação do detector	Dual
Taxa de fluxo do gás CH <sub>4</sub> (mL min <sup>-1</sup> )	0,9
Rpq	0,45
Rpa	0

#### 4.2.2 REAGENTES E MATERIAIS

O mosto cervejeiro foi produzido com as seguintes matérias primas: água do tipo mineral, obtida no comércio local do Município de Feira de Santana, Bahia; malte de cevada do tipo Pilsen (Castle Malting, Bélgica), adquirido em empresas especializadas do setor cervejeiro e fornecido em sacos de 25 kg; e lúpulo aromático e de amargor (Hopsteiner, E.U.A), adquiridos em empresas especializadas do setor, sendo o lúpulo aromático em Pellets tipo 90 com aproximadamente 7% de ácidos alfa e o lúpulo de amargor em Extrato CO<sub>2</sub> com aproximadamente 30% de ácidos alfa.

As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas na pesquisa (SC52, SC57 e SC82), foram isoladas e identificadas por SILVA (2009) e caracterizadas quanto a tolerância ao etanol, osmotolerância, termotolerância, produção de H<sub>2</sub>S e capacidade de floculação por PINHEIRO (2012). Estas cepas foram selecionadas anteriormente (Capítulo 2) como boas produtoras de cerveja e com os parâmetros fermentativos otimizados para a produção de cerveja suplementada com selênio (CAPÍTULO 3); estão preservadas em solução de glicerol 50% à 80 °C no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (LAPEM) da Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana – Bahia – Brasil e no Laboratório de Microbiologia Aplicada (LABMA) da Agroindústria da Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus – Bahia – Brasil.

Padrões de Selenometionina (Semet) e selenomethylselenocysteine (SeMetSeCys) (Sigma-Aldrich, Alemanha) foram utilizados, sendo preparadas soluções de trabalho por dissolução em HCl 3%. As soluções de selênio inorgânico foram preparadas por dissolução em água ultrapura a partir de selenito de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) e selenato de sódio (Na<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub>) (Merck, Alemanha). As soluções preparadas foram mantidas sob refrigeração a 4 °C. A hidrólise enzimática foi realizada utilizando a Protease XIV (Sigma-Aldrich, Alemanha), enzima não específica. Para a digestão ácida foi utilizado ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>), 3% (Merck, Alemanha).

A separação de espécies de selênio para a cromatografia foi realizada utilizando ácido cítrico 10 mM (Sigma-Aldrich, Alemanha), em 2% (v v<sup>-1</sup>) de metanol grau HPLC.

#### 4.2.3 PRODUÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

Foram produzidos 200 L de mosto cervejeiro a 12 °P a partir da moagem de 40 kg de malte pilsen, adicionando-se água e levados à etapa de mosturação (a rampa de mosturação é apresentada na Tabela 4.4). Em seguida, passou-se à etapa de filtragem (separando o líquido da casca do malte), e posteriormente à etapa de fervura quando foram adicionados os lúpulos (de amargor após 15 min de iniciada a fervura e aromático à 15 min do final da fervura, com tempo total de 60 min). Após a fervura o mosto cervejeiro produzido foi resfriado à temperatura ótima para início da etapa de fermentação. Para cada cerveja foi utilizado 100 L de mosto. Foram produzidas duas cervejas denominadas CSeSC52 (Cerveja suplementada com Selênio produzida com a cepa SC52) e CSeSC82 (Cerveja suplementada com Selênio produzida com a cepa SC82).

Tabela 4.4: Temperaturas, tempos de ativação e enzimas ativadas, presentes no mosto cervejeiro

Temperatura (°C)	Tempo (min)	Enzimas
35	20	Hemicelulases
45	10	Exopeptidases
52	10	Endopeptidases
62	20	Dextrinases e beta-amilases
72	20	Alfa-amilases
76	10	Inativação

#### 4.2.4 FERMENTAÇÃO

Os pontos otimizados para a etapa fermentativa (CAPÍTULO 3) de 25,0 °C de temperatura e 11 mg L<sup>-1</sup> de Se, e 23,5 °C de temperatura e 12 mg L<sup>-1</sup> de Se, foram utilizados para a produção das cervejas CSeSC52 e CSeSC82, respectivamente.

A fermentação foi conduzida nos tanques fermentadores com a concentração celular inicial de aproximadamente 1,2\*10<sup>7</sup> cel mL<sup>-1</sup>. O Se (na forma de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) foi adicionado no início da fermentação, com duração de 96 h. Foram coletadas amostras diárias para acompanhamento analítico do processo fermentativo.

Os resultados foram analisados a partir dos dados de etanol, densidade, extrato aparente e grau aparente de fermentação, os quais permitiram determinar: velocidade específica de crescimento de células em suspensão, velocidade específica de consumo de açúcares, velocidade específica de produção de etanol, calculadas utilizando as equações do método geométrico de cálculo de derivadas (LE DUY & ZAJIC, 1973) e tempo de geração, bem como rendimento em etanol e produtividade volumétrica em etanol (MOSER, 1988 & BORZANI, 1986):

1- Velocidade específica de crescimento de células em suspensão –  $\mu_x$  (h<sup>-1</sup>):

$$\mu_x = \left( \frac{1}{X_s} \right) \times \left( \frac{dX_s}{dt} \right)$$

2- Velocidade específica de consumo de açúcares –  $\mu_s$  (g gh<sup>-1</sup>):

$$\mu_s = \left( \frac{1}{X_s} \right) \times \left( \frac{dX_t}{dt} \right)$$

3- Velocidade específica de produção de etanol –  $\mu_P$  (g gh<sup>-1</sup>):

$$\mu_P = \left( \frac{1}{X_s} \right) \times \left( \frac{dP}{dt} \right)$$

4- Tempo de geração – Tg (h):

$$Tg = \left( \frac{0,693}{\mu M} \right)$$

5- Rendimento em etanol – Yp/s (g.g<sup>-1</sup>):

$$Y^{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S} = \left( \frac{P - P_i}{S_t - S_i} \right)$$

6- Produtividade Volumétrica em Etanol – Qp (g.Lh<sup>-1</sup>):

$$Qp = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \left( \frac{P - P_i}{t - t_i} \right)$$

Onde:

- ✓ Xs: Concentração de células em suspensão (g.L<sup>-1</sup>)
- ✓ St e Si: Concentração aparente inicial e no tempo t de extrato (g.L<sup>-1</sup>)
- ✓ Pi e P: Concentração inicial e no tempo t de etanol (g.L<sup>-1</sup>)
- ✓ ti e t : Tempo inicial e tempo t de fermentação (h)
- ✓ dXs : Concentração de células em suspensão gerada (g.L<sup>-1</sup>), no instante t
- ✓ dSi : Concentração aparente de açúcares totais consumidos (g.L<sup>-1</sup>), no instante t
- ✓ dP : Concentração de etanol produzido (g.L<sup>-1</sup>), no instante t
- ✓ μM : Velocidade específica máxima de crescimento de células em suspensão (h<sup>-1</sup>)

Após a fermentação seguiu-se à etapa de maturação ou fermentação secundária, quando são formados os compostos de aroma e sabor da cerveja. Nesta etapa a temperatura foi reduzida para 0 °C e teve duração de 15 dias. Finalizada a etapa fermentativa, as cervejas “selenizadas” foram separadas da levedura por centrifugação a 5000xg durante 10 min e o sobrenadante foi encaminhado para análises em Beer Analyser (equipamento analisador de cerveja). A fim de avaliar a influência do processo de carbonatação na formação de selenocompostos, as cervejas produzidas foram avaliadas antes e após carbonatação.

#### 4.2.5 DETERMINAÇÃO DE SELÊNIO TOTAL POR DRC-ICP-MS

A levedura residual e a cerveja selenizada obtidas foram preparadas para digestão em HPA-S com 1,0 mL de ácido nítrico ultrapuro e 1,0 mL de peróxido de hidrogênio. As soluções resultantes foram então diluídas para 10,0 ml com água desionizada antes da sua análise em DRC-ICP-MS, com quantificação do selênio total por calibrações externas e padrão.

#### 4.2.6 DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES DE SELÊNIO POR HPLC-ICP-MS

A extração dos compostos nas amostras de levedura e de cerveja selenizada foi realizada por hidrólise enzimática. Para as amostras de cerveja, em 4 mL foram adicionados 20 mg de protease XIV. Para as amostras de levedura em 100 mg foram adicionados 1,0 mL de água desionizada e 20 mg de protease XIV. A hidrólise foi realizada a 37 °C em a 200 rpm por 16 h. Os extratos obtidos foram centrifugados a 5000 g por 10 min e os sobrenadantes diluídos (quando necessário) e filtrados em membrana de 0,45 µM. O branco analítico foi produzido sem suplementação de selênio.

A identificação das espécies de selênio fora realizada por comparação do tempo de retenção a partir de padrões analíticos e Spike <sup>74</sup>Se. Picos analíticos foram avaliados como a área do pico.

#### 4.2.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

A validação do método foi realizada utilizando o material de referência certificado SELM-1 (Se-levedura, certificado para selênio total e selenometionina NRCC (Ottawa, Canadá).

## 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.3.1 CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

A Figura 4.1 (A e B) apresenta a variação das velocidades específicas de crescimento das células em suspensão, consumo de extrato aparente (“açúcares totais”) e produção de etanol, em função do tempo de 96 h, quando finalizou a fermentação (1,0 °P acima do tempo de atenuação). Pode-se observar que as velocidades específicas de consumo de extrato aparente ( $\mu_S$ ) e de produção de etanol ( $\mu_P$ ) apresentam perfis semelhantes à medida que o aumento do consumo de açúcares apresenta relação direta com a produção de etanol. A velocidade específica de crescimento ( $\mu_X$ ) da levedura também apresenta perfil semelhante às outras duas curvas, assim a produção do etanol, metabólito primário, está associada ao crescimento celular e ao consumo de extrato.

Observa-se também, que para a fermentação com a levedura CS52 (Figura 4.1A), os valores máximos de  $\mu_X$ ,  $\mu_S$  e  $\mu_P$  ocorreram no tempo de 12 h para  $\mu_X$  e foi  $0,08 \text{ h}^{-1}$ , de 48 h para  $\mu_S$ , sendo de  $0,25 \text{ g gh}^{-1}$  e  $0,13 \text{ g gh}^{-1}$  para  $\mu_P$  no tempo de 24 h. Para fermentação com a levedura SC82 (Figura 4.1B) os valores máximos foram de  $0,09 \text{ h}^{-1}$  para  $\mu_X$ , no tempo de 12 h; de  $0,427 \text{ g gh}^{-1}$  para  $\mu_S$  e  $0,017 \text{ g gh}^{-1}$  para  $\mu_P$ , ambas no tempo de 24 h. O tempo de geração da levedura ( $T_g$ ) foi de 8,20 h para a levedura SC52 e de 7,66 h para a levedura SC82.

A Tabela 4.5 apresenta os resultados de produtividade volumétrica em etanol e o rendimento em etanol durante o processo fermentativo, onde se observa a variação de  $Q_p$  entre  $0,35$  e  $0,84 \text{ g Lh}^{-1}$  para a cerveja CSeSC52 e entre  $0,38$  e  $0,84 \text{ g Lh}^{-1}$  para a cerveja CSeSC82. Apesar de tratar-se de leveduras diferentes pode-se inferir que a temperatura de fermentação não influenciou na  $Q_p$  (pois a CSeSC52 e a CSeSC82 fermentaram em temperaturas distintas,  $25,0 \text{ °C}$  e  $23,5 \text{ °C}$ , respectivamente), conforme já observado por outros autores (DRAGONE, *et. al.*, 2003; BRIGGS, *et. al.*, 2004; CARVALHO, 2009).

O Rendimento Aparente ou fator de conversão de substrato em produto ( $Y_p/s$ ) variou entre  $0,41$  e  $0,42 \text{ g g}^{-1}$  para ambas as cervejas. A influência da temperatura não ficou evidenciada. Estes resultados foram ligeiramente superiores ao encontrado por Dragone, *et. al.* (2003), de  $0,40 \text{ g g}^{-1}$ , em fermentação conduzida em fermentadores cilindro-cônicos de

180 L com volume útil de 140 L, utilizando mostos de 17,50 °P, fermentados por *Saccharomyces cerevisiae* lager à 12,5 °C.

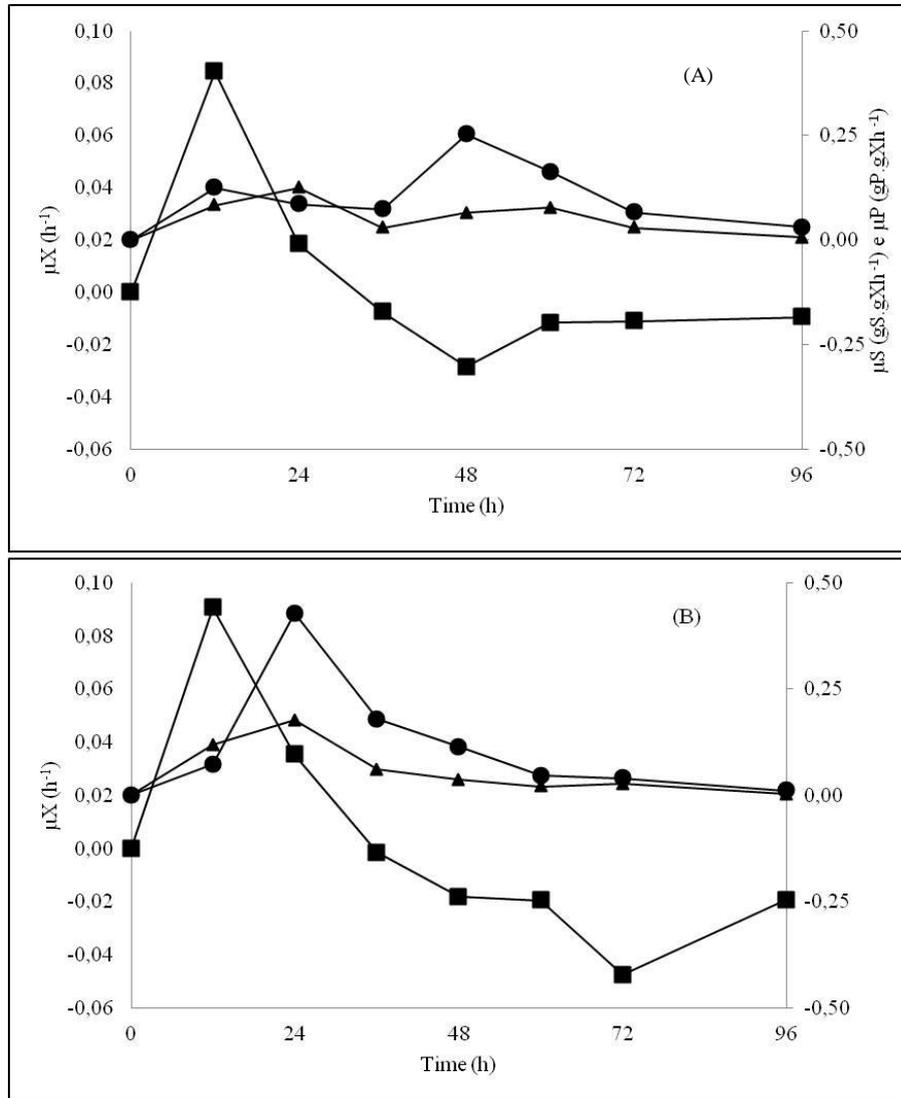


Figura 4.1 – Velocidades específicas de crescimento de células em suspensão ( $\mu_X$  - ■), consumo de extrato aparente ( $\mu_S$  - ●) e produção de etanol ( $\mu_P$  - ▲), na fermentação em mosto puro malte suplementado com selênio, com as leveduras SC52 (A) e SC82 (B)

Tabela 4.5: Produtividade volumétrica em etanol (Qp) e Rendimento Aparente (Yp/s) em cervejas suplementadas com selênio CSeSC52 e CSeSC82

TEMPO (h)	CSeSC52		CSeSC82	
	Qp (g Lh <sup>-1</sup> )	Yp/s (g g <sup>-1</sup> )	Qp (g Lh <sup>-1</sup> )	Yp/s (g g <sup>-1</sup> )
0	-	-	-	-
6	0,78	0,41	0,76	0,41
12	0,43	0,42	0,41	0,42
24	0,84	0,42	0,84	0,42
36	0,64	0,42	0,73	0,42
48	0,50	0,42	0,60	0,42
60	0,47	0,42	0,50	0,42
72	0,41	0,42	0,43	0,42
96	0,35	0,42	0,38	0,42

#### 4.3.2 SELÊNIO TOTAL

As concentrações de selênio total foram determinadas nas cervejas produzidas e nas leveduras utilizadas por DRC-ICP-MS com monitoração dos isótopos <sup>78</sup>Se e <sup>80</sup>Se, conforme procedimento descrito anteriormente. Na Tabela 4.6 é possível observar que para ambas as cervejas produzidas (CSeSC52 e CSeSC82) a maior concentração de selênio foi encontrada nas leveduras (SC52 e SC82), representando respectivamente, 99,19% e 99,38% do selênio total. Tais resultados eram esperados, tendo em vista a capacidade da *Saccharomyces cerevisiae* em acumular selênio. Nas cervejas produzidas foram encontrados 0,81% (0,089 ± 0,001 mg L<sup>-1</sup>) e 0,63% (0,074 ± 0,000 mg L<sup>-1</sup>) do selênio total em CSeSC52 e CSeSC82, respectivamente, sendo estes resultados superiores aos encontrados por Martínez, *et. al.* (2012) que em pesquisa sobre biotransformação de selênio em fermentações para produção de cerveja, obtiveram concentrações de selênio em cervejas comerciais que variaram entre 0,0092 ± 0,001e 0,0172 ± 0,001 mg L<sup>-1</sup>. Rodrigo, *et. al.* (2015), avaliando 128 marcas de cervejas comercializadas no Reino Unido encontraram teores de selênio inferiores a 0,02 mg L<sup>-1</sup>, concluindo também que as concentrações variam provavelmente em função da disponibilidade local do mineral.

Tabela 4.6: Selênio total nas cervejas produzidas e nas leveduras após fermentação

Amostras*	Isótopos monitorados	
	$^{78}\text{Se}$ (mg L <sup>-1</sup> )	$^{80}\text{Se}$ (mg L <sup>-1</sup> )
CSeSC52	0,089 ± 0,001	0,089 ± 0,001
SC52	10,870 ± 0,000	10,880 ± 0,001
CSeSC82	0,074 ± 0,000	0,075 ± 0,000
SC82	11,908 ± 0,001	11,816 ± 0,001

\*CSeSC52 – cerveja suplementada com selênio, produzida com a levedura SC52; LSC52 – levedura 52; CSeSC82 – cerveja suplementada com selênio, produzida com a levedura SC82; SC82 – levedura 82

A partir da Tabela 4.6 pode-se inferir também que para a cerveja CSeSC52 foi recuperado aproximadamente 99,72% dos 11 mg L<sup>-1</sup> do selênio adicionado e para a cerveja CSeSC82, dos 12 mg L<sup>-1</sup> recuperou-se 99,85%. Em termos comparativos, por exemplo, Silva (2009) trabalhando com bioespecação de selênio em amostras de cerveja obteve taxas de recuperação inferiores a 70%. Whang, *et. al.* (2010) em trabalho sobre enriquecimento de levedura *Saccharomyces* com selênio, em fermentação em batelada alimentada com alta densidade celular, obteve uma taxa de conversão de selênio de 62%. Portanto, o método proposto nesta pesquisa é relevante.

Considerando a Dose Diária Recomendada (DDR) de selênio para homens e mulheres de 55 µg dia<sup>-1</sup> (PEDRERO & MADRID, 2009), a partir dos resultados encontrados pode-se recomendar a ingestão de aproximadamente 600 mL da cerveja CSeSC52 e 740 mL da cerveja CSeSC82, de forma a não ultrapassar a DDR. Considerando a dose diária máxima recomendada (400 µg dia<sup>-1</sup>), o consumo máximo é de 4,5 L e 5,3 L das cervejas CSeSC52 e CSeSC82, respectivamente.

#### 4.3.3 QUANTIFICAÇÃO DE SELENOCOMPOSTOS

A Tabela 4.7 apresenta as concentrações de selênio obtidas nas amostras em análises realizadas em HPLC-ICP-MS após fermentações realizadas para produção de cerveja suplementada com selênio, adicionado como Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>. A fim de avaliar a influência do processo de carbonatação no teor de selênio, as cervejas produzidas foram avaliadas antes e após a carbonatação. É possível observar na Tabela 4.7 que nas duas cervejas produzidas as concentrações de Se<sub>TOTAL</sub>, SeMetSecys e SeMet foram superiores nas amostras não

carbonatadas (MSeSC52 e MSeSC82), evidenciando influência da carbonatação na concentração de Se.

A Figura 4.2 apresenta o cromatograma obtido em HPLC-ICP-MS dos padrões analíticos utilizados para a quantificação das concentrações de Se<sub>TOTAL</sub>, SeMetSecys e SeMet, com respectivos tempos de retenção. Na Figura 4.3 são apresentados os cromatogramas das amostras analisadas onde é possível observar a inexistência de pico de Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>, o que demonstra que o composto foi bioconvertido em organo-compostos de selênio e evidencia a eficiência das leveduras utilizadas. Corroborando o acima exposto, na Tabela 4.7 quando avaliadas com as cervejas não carbonatadas estas bioconvertaram 99,98% (SC52) e 99,91% (SC82) do selênio adicionado no início da fermentação e quando avaliadas com as cervejas carbonatadas as taxas de bioconversão foram de 99,77% (SC52) e 99,78% (SC82), sendo esta última a forma em que está disponível ao consumidor final. A SeMet representa o principal selenocomposto presente nas amostras analisadas.

Tabela 4.7: Se<sub>TOTAL</sub>, SeMetSecys e SeMet, após fermentação, utilizando HPLC-ICP-MS

<b>Amostra</b>	<b>Se<sub>TOTAL</sub> (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>SeMetSecys (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>SeMet (mg.L<sup>-1</sup>)</b>
CSeSC52	0,088 ± 0,001	0,006 ± 0,000	0,144 ± 0,001
MSeSC52	0,111 ± 0,006	0,029 ± 0,000	0,172 ± 0,001
LSC52	10,887 ± 0,087	0,741 ± 0,000	25,141 ± 0,048
CSeSC82	0,073 ± 0,001	0,005 ± 0,000	0,126 ± 0,001
MSeSC82	0,088 ± 0,001	0,031 ± 0,001	0,132 ± 0,000
LSC82	11,901 ± 0,029	1,109 ± 0,000	26,691 ± 0,058

\*CSeSC52 – cerveja suplementada com selênio, produzida com a levedura SC52; MSeSC52 – cerveja maturada (não carbonatada), produzida com a levedura SC52; LSC52 – levedura 52; CSeSC82 – cerveja suplementada com selênio, produzida com a levedura SC82; MSeSC82 – cerveja maturada (não carbonatada), produzida com a levedura SC82; SC82 – levedura 82; Se<sub>TOTAL</sub> – concentração de selênio total; SeMetSecys – concentração de metil-seleno-cisteína e SeMet – concentração de selenometionina.

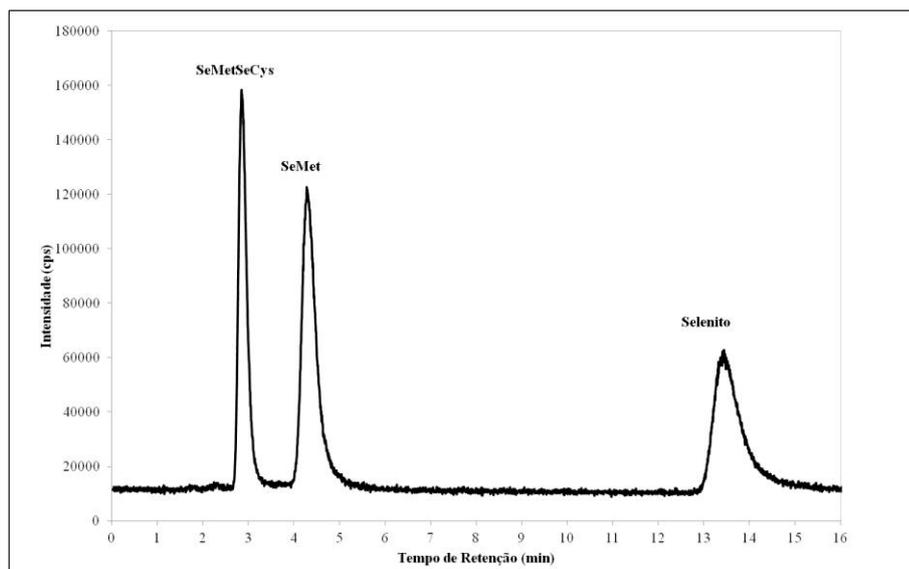


Figura 4.2 – Cromatograma obtido a partir de injeção de padrões analíticos em HPLC-ICP-MS

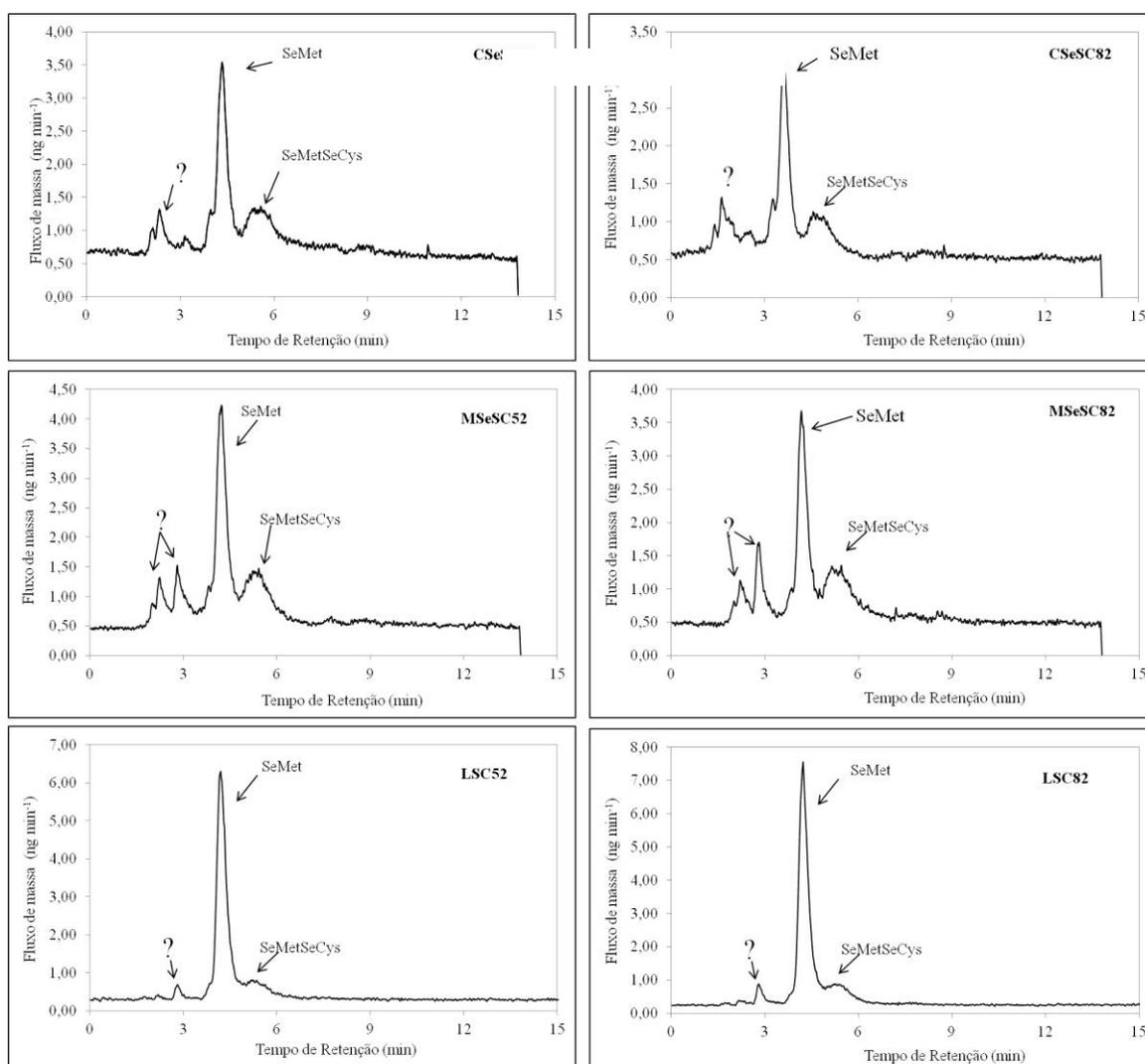


Figura 4.3 – Cromatogramas das amostras de cervejas carbonatadas (CSeSC52 e CSeSC82), cervejas não carbonatadas (MSeSC52 e MSeSC82) e de leveduras (LSC52 e LSC82), em HPLC-ICP-MS

#### 4.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir dos estudos cinéticos demonstraram que as fermentações realizadas seguem a mesma tendência de outros trabalhos realizados, permitindo inferir que o selênio não interferiu no processo fermentativo;

Do total de selênio adicionado no início da fermentação para a cerveja CSeSC52 foi recuperado aproximadamente 99,72% dos 11 mg L<sup>-1</sup> e para a cerveja CSeSC82, dos 12 mgL<sup>-1</sup> de selênio adicionado recuperou-se 99,85%. Taxas de conversão/recuperação acima de 60% são consideradas excelentes em trabalhos desta natureza;

As maiores concentrações de selênio foram encontradas nas leveduras, evidenciando a sua capacidade de bioacúmulo quando se refere a este mineral. Não foi observado diferença nos teores de selênio total quando comparadas as metodologias DRC-ICP-MS e HPLC-ICP-MS, indicando que quando a pesquisa objetivar realizar trabalhos de especificação de selênio não é necessário utilizar outra metodologia para determinação de selênio total;

Conforme já observado em outros trabalhos semelhantes, a metodologia HPLC-ICP-MS mostrou-se eficiente para especificação de selênio em leveduras e cervejas, sendo que o principal selenocomposto identificado nas amostras foi a selenometionina e o composto orgânico utilizado como fonte de Se (Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub>) não foi identificado nas amostras, evidenciando a eficiência das leveduras utilizadas na bioconversão.

As cervejas produzidas podem ser indicadas para produção em escala industrial nas condições apresentadas na pesquisa, entretanto com o devido informativo ao consumidor sobre o volume máximo de ingestão de forma a evitar possível intoxicação por excesso de selênio.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAUM, M. K.; CAMPA, A.; MIGUEZ-BURBANO, M. J.; BURBANO, X.; SHOR-POSNER, G. Role of selenium in VIH/AIDS. In: HATFIELD, D. L. (Ed.), *Selenium - its Molecular Biology and Role in Human Health*. pp. 247-255. Kluwer Academic Publishers (2001).

BECK, M. A. Selenium as antiviral agent. In: HATFIELD, D. L. (Ed.), *Selenium - its Molecular Biology and Role in Human Health*. pp. 235-245. Kluwer Academic Publishers (2001).

BEHNE, D.; WEILER, H.; KYRIAKOPOULOS, A. Effects of selenium deficiency on testicular morphology and function in rats. *J. Reprod. Fertil.*, 106 (1996), p. 291.

BORZANI, W. Cinética de processos fermentativos. *Revista Brasileira de Engenharia*, v.3, n.2, p.61, 1986.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. *Brewing Science and practice*. Woodhead Publishing Limited, Cambridge, UK. (2004), 863 p.

CARVALHO, G. B. M. Obtenção de cerveja usando banana como adjunto e aromatizante. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial. Área de Concentração: Conversão de biomassa) – Escola de Eng. de Lorena da USP. São Paulo, 2009.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos Fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte – As leveduras. *Analytica*, (2006), 25, p 36-42.

CERVBRASIL – Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. Disponível em: [http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2015\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf) Acessado em: 25/10/2016.

COMBS JR., G. F.; COMBS, S. B. Selenium and cancer. In: COMBS JR., G. F. *The Role of Selenium in Nutrition*. pp.413-461. Academic Press, Inc., New York (1986).

DRAGONE, G.; SILVA, D. P.; SILVA, J. B. A.; LIMA, U. A. Improvement of the ethanol productivity in a high gravity brewing at pilot plant scale. *Biotechnology Letters*, July 2003, Volume 25, Issue 14, pp 1171–1174.

LE DUY, A.; ZAJIC, J. E. A Geometrical Approach for Differentiation of an Experimental Function at a Point: Applied to Growth and Product Formation. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, v. 15, p. 805-810, 1973.

MARTÍNEZ, M. S.; SILVA, E. P. G.; PÉREZ-CORONA, T.; CÁMARA, C.; FERREIRA, S. L. C.; MADRID, Y. Selenite biotransformation during brewing. Evaluation by HPLC–ICP–MS. *Talanta*, 88 (2012) Pages 272–276

- MOSER, A. Bioprocess Technology. *Kinetics and Reactors*. New York: Springer-Verlag, 1988, 451p.
- NEVÉ, J. Selenium as a Risk Factor for Cardiovascular Diseases. *Journal Cardiovascular Risk*, 3 (1996), p. 42.
- OLDEREID, N. B.; TOMASEN, Y.; PURVIS, K. Selenium in human male reproductive organs. *Human Reprod.*, 13 (1998), p. 2172.
- PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 634 p. 135–152, 2009.
- PINHEIRO, C. S. R. *Seleção de leveduras produtoras de etanol como suporte para a produção de álcool combustível e cachaça artesanal por produtores rurais*. 2012. 94p. Tese de Doutorado (Doutor em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2012.
- RODRIGO, S.; YOUNG, S. D.; COOK, D.; WILKINSON, S.; CLEGG, S.; BAILEY, E. H.; MATHERS, A. W.; BROADLEY, M. R. Selenium in commercial beer and losses in the brewing process from wheat to beer. *Food Chemistry*. 182 (2015) 9-13.
- SILVA, A. F. *Caracterização genética de linhagens de Saccharomyces cerevisiae isoladas de fermentações artesanais de cachaças da Bahia*. 2009. 117p. Dissertação de Mestrado (Mestre em Biotecnologia) – Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana, 2009.
- SILVA, E. G. P. *Estratégias analíticas para determinação direta de metais em alimentos e bioespecação de selenoproteínas em cerveja utilizando HPLC-ICP-MS*. 2009. 123p. Tese de Doutorado (Doutor em Química) – Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2009.
- TAPIERO, H; TOWNSEND, D. M; TEW, K.D. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57 (2003), pp 134-144.
- WHANG, Z.; ZHANG, L.; TAN, T. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS2 for selenium-enriched yeast production. *Korean J. Chem. Eng.* 27(6), 1836-1840 (2010). DOI: 10.1007/s11814-010-0300-x

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A seleção de leveduras para produção de cervejas no Brasil ainda é bastante incipiente e, constituindo um dos objetivos desta pesquisa, foi possível selecionar três leveduras (SC52, SC57 e SC82) para produção de cerveja, sendo que estas apresentaram resultados fermentativos superiores às leveduras comerciais (S-23 e S-04) utilizadas como parâmetro de controle;

Com o objetivo de produzir cerveja artesanal suplementada com selênio foram realizados estudos com as leveduras selecionadas previamente a fim de otimizar os parâmetros temperatura de fermentação e concentração de selênio com resultados significativos estatisticamente para as leveduras SC52 e SC82, sendo estas indicadas para a produção da cerveja suplementada;

Foram produzidas duas cervejas artesanais suplementadas com selênio (CSeSC52 e CSeSC82) nas quais foram quantificados os teores de selênio total e dos selenocompostos formados, em que a selenometionina o principal composto encontrado (tanto nas cervejas quanto nas leveduras), sendo indicado para consumo, em função da Dose Diária Recomendada, aproximadamente 600 mL da CSeSC52 e 740 mL da CSeSC82. Os teores de selênio total e selenocompostos encontrados nas leveduras foram superiores aos encontrados nas cervejas, nos permitindo inferir sobre a possibilidade de reuso destas (prática comum nas grandes cervejarias) como possível fonte para biodisponibilizar selênio em novas cervejas produzidas;

As metodologias e técnicas utilizadas mostraram-se eficientes na medida em que todos os objetivos propostos foram alcançados, nos permitindo concluir que a pesquisa foi realizada com êxito.