

ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS DE CERVEJAS OBTIDAS COM LEVEDURAS RECICLADAS

Fabio da Silva Franco

Fatec Piracicaba Deputado Roque Trevisan - fabio.franco@fatec.sp.gov.br

Daniela Defavari do Nascimento

Fatec Piracicaba Deputado Roque Trevisan

Gisele Gonçalves Bortoleto

Fatec Piracicaba Deputado Roque Trevisan - gisele.bortoleto@fatec.sp.gov.br

Introdução

A cerveja é uma bebida obtida através da fermentação alcoólica do mosto, este elaborado por ingredientes como o malte, lúpulo, água e adjuntos. O processo de fermentação alcoólica implicará na transformação de açúcares em etanol, dióxido de carbono e outros compostos responsáveis pelo aroma e sabor da bebida [1].

De acordo com o anuário da cerveja de 2021 publicado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, houve um crescimento de 12% do número de cervejarias registradas no Brasil, resultando em número total de 1549 cervejarias registradas e 35741 produtos registrados para a cerveja [2]. Neste sentido, com essa crescente quantidade de cervejarias e produtos relacionadas à cerveja, se faz de grande importância utilizar metodologias analíticas para monitorar os principais responsáveis pelo aroma e sabor (flavor) das cervejas, visto que suas análises são relevantes para o controle de novos produtos [3].

Embora que as diversas cepas de leveduras empregadas na fermentação realizem a função primária de transformar os açúcares em etanol e dióxido de carbono, outros subprodutos como os VOCs diferem de uma cepa para outra em consequência de diferenças bioquímicas de metabolismo das mesmas [3]. Deste modo, o reciclo de leveduras pode ocasionar em diferenças no processo fermentativo, assim, se faz necessário investigá-lo com o intuito de obter-se um melhor entendimento da eficiência do fermento nos ciclos para fermentações subsequentes versus a qualidade de sabores e aromas da bebida.

1. Metodologia

As cervejas que foram produzidas na FATEC Piracicaba, foram elaboradas pela professora Dr^a. Daniela Defavari do Nascimento e sua orientada, também bolsista do CNPq. As leveduras utilizadas foram de linhagens não comerciais previamente obtidas e isoladas em trabalhos anteriores da unidade, sendo elas “Modena”, “Alessandro” e “Índigena”. A levedura “Modena” corresponde a cepa cervejeira proveniente de cervejaria da Itália. As demais cepas são leveduras usualmente empregadas na produção de cachaça artesanal. A reativação e multiplicação destas leveduras, foi feita em meio YPD líquido, sob agitação orbital a 150rpm e 25°C por 16 horas. O mosto cervejeiro (tipo Soul-IPA), foi preparado conforme o padrão já pré-

estabelecido por microcervejaria parceira, em volume suficiente para o preparo de todas as cervejas, em escala laboratorial, ao longo deste projeto. Após o preparo e resfriamento do mosto, o mesmo foi repartido e congelado a uma temperatura de -80°C até o uso. A primeira cerveja, em escala laboratorial de 125mL, foi produzida com leveduras reativadas. Esta primeira cerveja foi fermentada por 7 dias a 18°C e maturada por mais 14 dias a 8°C. A mesma foi considerada como amostra padrão, a fim de ser comparada com as demais cervejas produzidas, justamente a partir do reuso dessas leveduras. Ao todo, foram efetuados 4 ciclos de produção de cerveja. As cervejas produzidas a partir desses ciclos foram subdivididas em 2 tratamentos: Tratamento 1 – Cervejas produzidas com leveduras de reciclo puro; Tratamento 2 - Cervejas produzidas com leveduras de reciclo, porém previamente “recondicionadas” nos laboratórios da Fatec Piracicaba, sob agitação orbital de 15-rpm por 1 hora em mosto diluído a 50% com água autoclavada.

As cervejas produzidas na microcervejaria empregaram uma única levedura comercial, que partiu do inóculo seco para a chamada geração 0 ou geração R (nomenclatura utilizada na cervejaria), e que foi sendo destinada para as gerações seguintes, sem nenhum pré- tratamento, denominadas geração 1, 2, 3, e assim sucessivamente.

As análises cromatográficas foram conduzidas conforme protocolo proposto por Bortoleto e Gomes [3], em cromatógrafo PerkinElmer, modelo GC Clarus 600, equipado com coluna cromatográfica capilar HP- INNOWAX (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) e detector de ionização de chama (FID). O amostrador automático empregado é da marca Combipal, modelo CTC Analytics, Pal System, com o forno para *headspace*. O gás de arraste utilizado é o N₂, com fluxo de 1,2 mL min⁻¹, e H₂ e ar sintético com fluxo de 45 mL min⁻¹ e 450 mL min⁻¹, respectivamente, todos de alto grau de pureza (99,999%). A temperatura do injetor foi de 150 °C e a temperatura da coluna foi programada para 45 °C por 3 min, com aquecimento a uma taxa de 7,5 °C min⁻¹, até 60 °C, na qual aplica-se outra taxa de 15 °C min⁻¹ até 165 °C, totalizando 12 min de corrida. A temperatura do detector foi de 300 °C.

Os dados foram avaliados por um colaborador chamado Wiston Pinheiro Claro Gomes por meio da análise de variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey, ao nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$) utilizando o software OriginPro 2023 (10.0.0.154 -Student Version).

2. Resultados e Discussões

As Tabelas 1 a 3 referem-se aos resultados das análises das cervejas produzidas pela microcervejaria

parceira. É importante destacar que foi possível coletar e monitorar o processo fermentativo das cervejas geração 0 (denominada pela cervejaria de geração R), geração 2 e geração 5.

Tabela 1: monitoramento realizado da fermentação da cerveja geração 0, produzida na microcervejaria.

Tempo (Dias)	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Alcool Isoamilico (mg/L)	Etanol (%)
0	63,40	-	2,68	3,44	28,93	0,05
1	19,91	-	1,30	1,51	16,36	0,07
2	44,34	0,34	2,55	3,67	28,50	0,22
3	44,06	0,38	2,17	3,16	25,33	0,51
4	30,59	0,53	2,30	3,73	30,24	0,60
5	60,53	1,60	3,83	7,23	52,48	1,31
6	-	-	-	-	-	-
7	39,51	11,65	7,98	19,75	109,70	4,18
8	27,50	14,98	7,39	18,74	102,30	4,44
9	19,58	13,37	7,57	18,47	99,26	4,49
10	21,11	14,03	8,15	20,31	111,77	4,60
11	-	-	-	-	-	-
12	3,26	9,53	8,07	19,60	106,20	4,39
13	-	-	-	-	-	-
14	18,09	10,85	8,20	20,21	109,22	4,49

Fonte: Autores.

Tabela 2: monitoramento realizado da fermentação da cerveja geração 2, produzida na microcervejaria.

Tempo (Dias)	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Alcool Isoamilico (mg/L)	Etanol (%)
0	-	-	-	-	-	-
1	27,04	2,16	3,64	7,15	43,15	1,02
2	36,15	5,56	6,23	13,01	73,81	2,35
3	78,16	6,07	7,07	14,30	77,78	3,02
4	-	-	-	-	-	-
5	34,21	17,09	8,42	21,07	112,46	5,02
6	18,07	23,211	8,04	22,26	110,83	4,68
7	-	-	-	-	-	-
8	24,11	23,81	8,72	20,68	103,12	4,99
9	38,88	22,36	9,83	23,50	123,15	4,79
10	54,09	9,05	8,47	20,08	104,06	4,76
11	-	-	-	-	-	-
12	26,84	26,79	9,05	22,4	115,43	4,81

Fonte: Autores.

Tabela 3: monitoramento realizado da fermentação da cerveja geração 5, produzida na microcervejaria.

Fonte: Autores.

Os resultados obtidos das cervejas de reciclo produzidas na FATEC Piracicaba estão dispostos nas Tabelas 4 a 6, com as cepas Alessandro, Indígena e Modena identificadas como grupos A, B e C, respectivamente.

De acordo com a Tabela 1, observa-se que durante a fermentação houve um crescimento seguido de estabilização, das concentrações dos diferentes analitos, exceto para o acetaldeído que apresentou uma enorme variação na concentração no decorrer do processo. De qualquer forma, destaca-se

que na bebida final, a concentração deste composto se estabilizou abaixo do limite de 20 mg/L. Vale-se dizer

Tempo (Dias)	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Alcool Isoamilico (mg/L)	Etanol (%)
0	-	-	-	-	-	-
1	26,34	1,05	3,95	3,72	33,37	0,82
2	35,56	2,68	6,96	7,36	63,30	1,84
3	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	40,24	19,45	13,67	17,72	131,86	4,59
6	43,93	16,95	13,98	17,21	134,68	4,62
7	42,16	15,28	14,16	17,43	132,25	4,74
8	40,47	24,67	13,85	17,43	132,78	5,00
9	38,75	22,46	13,08	17,24	145,63	5,27
10	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-
13	25,88	21,01	15,97	19,53	144,84	5,10

que todos os compostos estão dentro da faixa esperada e abaixo do limite de percepção sensorial na bebida final (14º dia) [4]. Segundo as Tabelas 2 e 3, os perfis dos VOCs apresentaram comportamento semelhante. Por outro lado, quando comparamos os resultados da geração 0 com as gerações 2 e 5, observamos que o acetato de etila apresentou um aumento considerável na sua concentração assim como o acetaldeído, sendo que este último analito ficou acima do limite de percepção sensorial, apresentando-se como um defeito da bebida [3].

Tabela 4: resultados da cerveja de cepa grupo A, produzida na FATEC.

Amostras	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Alcool Isoamilico (mg/L)	Etanol (% (v/v))
Ciclo 0	39,67	4,24	7,10	11,22	63,39	1,65
Ciclo 1	74,42	17,04	26,39	30,73	122,22	3,84
Ciclo 1Ac	84,35	15,66	28,14	31,22	134,46	3,65
Ciclo 2	22,82	4,29	14,91	12,66	49,43	2,72
Ciclo 2 Ac	3,22	-	-	-	-	0,11
Ciclo 3	24,76	3,96	12,56	10,46	43,35	2,08
Ciclo 3 Ac	94,74	12,03	15,95	13,05	40,04	1,99
Ciclo 4	57,18	4,50	13,48	12,09	51,19	2,48
Ciclo 4 Ac	26,05	4,62	8,27	9,35	40,29	3,18

Fonte: Autores.

Observando a Tabela 4, uma atenção especial deve ser dada ao etanol, que deve estar entre 4 e 5 % (v/v), considerando a receita empregada. Dessa forma, a levedura A não se mostrou eficaz para a produção da cerveja em questão. Já em relação aos demais analitos, observa-se uma variação considerável das concentrações dos mesmos nas diferentes amostras das diferentes gerações e altas concentrações do acetaldeído, ou seja, valores acima de 20 mg/L são perceptíveis ao paladar de forma negativa. Isso sugere que talvez as leveduras estudadas não sejam adequadas para a produção da bebida e/ou que o processo da produção das mesmas precise de ajustes, como maior tempo de maturação. Para os demais analitos, destaca-se que todos estão dentro da faixa esperada [4].

Tabela 5: resultados da cerveja de cepa Indígena produzida na FATEC.

Amostras	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Álcool Isoamílico (mg/L)	Etanol (% (v/v))
Ciclo 0	136,18	8,43	11,98	15,58	90,74	3,47
Ciclo 1	130,03	12,22	18,93	23,88	126,18	4,43
Ciclo 1Ac	82,00	9,99	18,26	22,12	115,76	4,46
Ciclo 2	30,51	3,98	5,08	6,82	30,77	1,77
Ciclo 2 Ac	8,03	2,16	5,44	6,74	32,78	1,62
Ciclo 3	31,65	1,68	6,91	7,48	38,31	2,42
Ciclo 3 Ac	172,86	4,77	13,73	13,65	52,18	3,24
Ciclo 4	74,70	2,12	12,10	10,92	57,99	4,53
Ciclo 4 Ac	21,30	6,85	15,08	12,44	58,93	4,97

Fonte: Autores.

Segundo a Tabela 5, observa-se que quanto à concentração do etanol somente as amostras da geração 1 e da geração 4 estão de acordo com o valor esperado segunda a receita empregada, entre 4 e 5 % (v/v). Novamente, no que se refere ao acetaldeído, os valores encontrados ainda estão acima de 20 mg/L, o que implica em uma percepção negativa ao paladar [4]. Uma observação importante é que o acondicionamento nas gerações 1 e 4 pareceu diminuir a concentração do acetaldeído na bebida final. Isso sugere que talvez com possíveis ajustes, estas leveduras possam ser adequadas para a produção de bebida.

Tabela 6: resultados da cerveja de cepa Alessandro produzida na FATEC.

Amostras	Acetaldeído (mg/L)	Acetato de Etila (mg/L)	N-Propanol (mg/L)	Isobutanol (mg/L)	Álcool Isoamílico (mg/L)	Etanol (% (v/v))
Ciclo 0	181,51	6,46	8,96	14,61	77,58	3,23
Ciclo 1	45,98	5,06	9,96	15,45	79,54	4,64
Ciclo 1Ac	128,33	13,85	19,33	27,81	138,39	4,92
Ciclo 2	23,93	2,43	2,44	5,14	21,47	1,46
Ciclo 2 Ac	23,97	2,30	4,93	7,20	28,91	1,98
Ciclo 3	48,95	3,46	5,83	8,46	37,02	3,16
Ciclo 3 Ac	114,34	2,89	12,66	14,08	44,63	3,33
Ciclo 4	30,04	3,93	10,59	12,20	50,69	5,11
Ciclo 4 Ac	27,37	4,42	11,53	12,10	47,40	4,50

Fonte: Autores.

De acordo com a Tabela 6, observamos o mesmo comportamento dessa levedura em comparação com a levedura B, ou seja, etanol em concentrações adequadas para as gerações 1 e 4, mas com aumento do acetaldeído com o acondicionamento da levedura, no caso da análise da geração 1.

As análises estatísticas evidenciaram que, de forma geral, não importa o reciclo (diferentes gerações) ou o tratamento (acondicionamento da levedura antes de ser empregada no processo novamente) as concentrações dos VOCs presentes em cada bebida são estatisticamente diferentes.

Uma observação relevante quanto ao acondicionamento da levedura antes de ser empregada em novo processo fermentativo é que levam a formação mais controlada dos VOCs, com poucas exceções de alguns reciclos. O fato de não acondicionar o fermento leva a produção de VOCs em elevadas concentrações.

3. Conclusões

Foi possível determinar VOCs nas amostras de cervejas produzidas tanto na FATEC como na microcervejaria local, pareira deste projeto.

Embora que os resultados forneçam indícios do comportamento das leveduras que passam por reciclos, como é o caso do aumento da concentração do etanol à medida que a levedura é reutilizada, ainda se faz necessário acompanhar mais gerações quanto à formação dos VOCs e analisar tais resultados estatisticamente.

4. Referências

- [1] LIMA, L. L. A.; FILHO, A. B. M. Tecnologia de Bebidas. Recife. EDUFRPE, 2011.
- [2] MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA – MAPA – Anuário Estatístico da Cerveja – 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias-2022/numero-de-cervejarias-registradas-no-brasil-cresce-12-em-2021>>. Acesso em Fev 2023.
- [3] BORTOLETO, G. G.; GOMES, W. P. C. Determination of ethanol in low-alcohol fermented beverages. *Sítio Novo*, v. 6, n. 2, 2022.
- [4] BORTOLETO, G. G.; GOMES, W. P. C. Determination of volatile organic compounds in craft beers by gas chromatography and headspace sampling. *Research, Society and Development*, v. 9, n. 9, 2020.

Agradecimentos

Ao CNPq e CPS pela bolsa concedida. A todos que colaboraram ou ajudaram de alguma forma para a realização deste trabalho e, em especial, a família e aos amigos por todo apoio durante o trajeto.