



PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL PELA FERMENTAÇÃO DE UMA  
LEVEDURA DA JABUTICABA: ANÁLISE DA CINÉTICA LOCAL DE  
METABÓLITOS VOLÁTEIS E DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO

Letícia Maia Rezende Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos Costa da Silva Pinto

Rio de Janeiro

Julho de 2017

PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL PELA FERMENTAÇÃO DE UMA  
LEVEDURA DA JABUTICABA: ANÁLISE DA CINÉTICA LOCAL DE  
METABÓLITOS VOLÁTEIS E DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO

Letícia Maia Rezende Costa

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO  
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA  
(COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE  
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE  
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

---

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

---

Prof. Maurício Bezerra de Souza Jr, D.Sc.

---

Prof. Rodrigo Volcam Almeida, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2017

Costa, Letícia Maia Rezende

Produção de cerveja artesanal pela fermentação de uma levedura da Jabuticaba: Análise da cinética local de metabólitos voláteis e dos efeitos das variáveis no processo/ Letícia Maia Rezende Costa. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XVII, 127 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos Costa da Silva Pinto

Dissertação (Mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 95-102.

1. Cerveja Artesanal. 2. Levedura da Jabuticaba. 3. Metabólitos voláteis. 4. Modelagem Empírica. I. Alves, Tito Lívio Moitinho *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*A Deus e minha amada família,*

*Lucas, Marília e Robson.*

*“Entrega o teu caminho ao senhor; confia nele e ele o fará.”*

Salmos 37, Bíblia Sagrada.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, que tornou essa realização possível, amparando-me e renovando a cada momento minha força e fé para seguir em frente.

A meus pais, meu irmão e minha vó, pelo amor e apoio incondicional. Pelo incentivo nas horas mais difíceis. Por comemorarem comigo cada vitória. Por abdicarem muitas vezes de suas prioridades colocando-me em primeiro lugar. Por terem me ensinado os maiores valores, como humildade, dedicação e perseverança, que carrego comigo e que foram fundamentais para eu chegar até aqui.

A meus orientadores, Tito Moitinho e Zé Carlos, a quem devo agradecer pelo apoio, confiança, paciência e estímulo dado, que foram imprescindíveis para realização deste trabalho. Quero expressar o meu reconhecimento e admiração pela vossa competência profissional e minha gratidão por todos os ensinamentos que me foram passados e que foram fundamentais para meu crescimento profissional, pessoal, como aluna e pesquisadora.

A meus companheiros/anjos de laboratório, Mônica, Kalil e Lidiana, que com toda paciência do mundo e dedicação, me proporcionaram grande ajuda e aprendizado no laboratório de Bioprocessos, o que ajudou a me tornar uma profissional mais experiente e responsável. Minha gratidão pela vossa amizade, pelas caronas, por serem pessoas tão humildes, de grande coração e excelentes profissionais.

À minhas tias lindas, que gentilmente me receberam em sua casa e me deram todo o apoio para que o mestrado fosse possível, não só físico, como sentimental. A meus migões maravilhosos e que sempre me apoiaram, torceram por mim e aguentaram minhas reclamações e desabafos. Aos amigos que a engenharia química trouxe, não só aqui no mestrado, mas por todo Brasil, parceiros de luta e das minhas maiores alegrias. A todos os citados, vocês estarão sempre em meu coração e serão, aonde quer que eu vá, a razão para eu continuar.

Resumo da Dissertação apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências (M.Sc.)

PRODUÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL PELA FERMENTAÇÃO DE UMA  
LEVEDURA DA JABUTICABA: ANÁLISE DA CINÉTICA LOCAL DE  
METABÓLITOS VOLÁTEIS E DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO

Letícia Maia Rezende Costa

Julho/2017

Orientadores: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos Costa da Silva Pinto

Programa: Engenharia Química

Cervejas são bebidas fermentadas que têm estado presente na humanidade por milhares de anos. O mercado cervejeiro atual abrange um número cada vez maior de consumidores e, em meio a um cenário de crise, aposta em produtos de alta qualidade para se manter em alta: as cervejas artesanais. Embora o processo de produção seja bem definido, uma ampla gama de estudos tem sido realizada a fim de aumentar a qualidade final do produto. A fermentação, etapa na qual a levedura fermenta o mosto, gerando os compostos organolépticos da cerveja, é a mais importante do processo. Sabe-se que algumas variáveis desta etapa influenciam a formação dos metabólitos. Porém, não há muitas informações na literatura sobre como isso ocorre, com que intensidade, nem sobre o efeito de sinergia entre as variáveis. A importância de utilizar a biodiversidade da microbiota brasileira para a produção de produtos biotecnológicos também vem sendo discutida. Valorizar o produto nacional e diminuir os custos de importação são grandes vantagens apresentadas. Por tudo isso, neste trabalho uma cepa de levedura extraída da casaca da jabuticaba foi utilizada. O microrganismo foi identificado e seu potencial fermentativo foi avaliado. Durante a fermentação para produção de cerveja artesanal, foi estudado como algumas variáveis do processo influenciam a produção de voláteis. Um planejamento fatorial foi proposto e uma modelagem empírica foi desenvolvida, tornando possível o controle da fermentação e uma melhor qualidade da cerveja artesanal obtida.

Abstract of Dissertation presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

LOCAL KINETIC ANALYSIS OF VOLATILE METABOLITES THROUGH  
FERMENTATION BY A JABUTICABA YEAST DURING CRAFT BEER  
PRODUCTION

Letícia Maia Rezende Costa

July/2017

Advisors: Tito Lívio Moitinho Alves

José Carlos Costa da Silva Pinto

Department: Chemical Engineering

Beers are fermented beverages that have been present in mankind for thousands of years. The brewing market has increased continuously and, in the midst of a crisis scenario, has bet on high quality products to keep up, such as craft beers. Despite the well-defined production process, many studies have been carried out in order to enhance the final quality of the product. Fermentation is the most important step in the beer production process. At this stage, the yeast feeds on sugar of the beer wort, generating the organoleptic compounds of beer as by-products. It is known that some operation parameters of this stage affect the production of volatile products, but there is not much information on how this occurs, how intense the process is and what sinergetic effects exist among the variables. The importance of using the diversity of the Brazilian microbiota for the production of biotechnological products has also been discussed. Valuing the national product and reducing import costs are some of the advantages of using national products. In this study, a strain of yeast extracted from jabuticaba was applied for production of beer. The microorganism was identified and its fermentative potential was evaluated. During the fermentation step for craft beer production, the influence of some variables on the generation of volatile products was studied. A factorial plan was proposed and an empirical modeling was developed, enabling the control of the fermentation and the manufacture of craft beer of better quality.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. OBJETIVO .....</b>	<b>2</b>
1.1.1. Objetivos específicos .....	2
<b>1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. A CERVEJA ARTESANAL .....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA .....</b>	<b>6</b>
2.2.1. Processo em batelada (descontínuo) .....	7
2.2.2. Variáveis que influenciam na fermentação .....	8
2.2.2.1. Temperatura .....	9
2.2.2.2. pH.....	10
2.2.2.3. Fonte de Carbono .....	11
2.2.3. A levedura .....	12
<b>2.3. METABÓLITOS VOLÁTEIS .....</b>	<b>14</b>
<b>2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS.....</b>	<b>19</b>
2.4.1. Cromatografia Gasosa.....	19
2.4.2. Extração líquido-líquido com Salting Out .....	23
<b>2.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>23</b>
2.5.1. Planejamento Fatorial.....	24
2.5.2. Testes Estatísticos .....	25
2.5.2.1. Distribuição t de Student.....	25
2.5.2.2. Distribuição de Fisher .....	27
2.5.3. Modelagem Empírica .....	28
2.5.4. Modelagem e Microcinética.....	29
<b>2.6. COMENTÁRIOS FINAIS.....</b>	<b>31</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>

<b>3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>32</b>
<b>3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>33</b>
3.2.1. Microrganismo .....	33
3.2.2. Preparo e padronização do inóculo .....	34
3.2.3. Meio de fermentação.....	35
3.2.4. Fermentações.....	37
3.2.5. Medição do grau brix (°Br).....	39
3.2.6. Viabilidade Celular .....	40
<b>3.3. ANÁLISES.....</b>	<b>42</b>
3.3.1. GCMS .....	42
3.3.2. GC .....	42
3.3.3. Extração Líquido-Líquido com salting-out.....	43
3.3.4. Curvas de calibração para cada componente volátil .....	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>45</b>
<b>4.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DA LEVEDURA .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2. CARACTERIZAÇÃO DA LEVEDURA COMO ALE OU LAGER.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3. VIABILIDADE CELULAR .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4. ENSAIOS FERMENTATIVOS.....</b>	<b>47</b>
4.4.1. Avaliação do perfil de concentração dos metabólitos voláteis durante a fermentação alcoólica.....	50
4.4.2. Avaliação da estabilização dos metabólitos ao fim da maturação .....	60
<b>4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....</b>	<b>62</b>
4.5.1. Análises das matrizes de correlação.....	69
4.5.2. Análises das direções principais do processo: PCA.....	75
4.5.3. Modelagem empírica das variáveis do processo .....	77
<b>5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>92</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>

<b>APÉNDICE A .....</b>	<b>103</b>
<b>APÉNDICE B .....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do processo cervejeiro (Adaptado de: TRINDADE, 2014).....	6
Figura 2. Esquema da fermentação alcoólica de leveduras utilizando a glicólise como rota metabólica. ....	7
Figura 3. Super-rota metabólica para formação dos produtos da fermentação a partir da glicose (DIAS, 2001).....	16
Figura 4. Rota metabólica para a formação de álcoois superiores, como 2-metil-1-butanol (HAZELWOOD et al., 2008). ....	17
Figura 5. Rota de Ehrlich para a formação do Álcool fenetílico ou 2-feniletanol (ETSCHMANN et al., 2003).....	18
Figura 6. Rota metabólica para formação de ésteres de acetato (PIRES et al., 2014)...	19
Figura 7. Esquema de um cromatógrafo gasoso (Adaptado de: QUÍMICA INSTRUMENTAL, 2017).....	20
Figura 8. Esquema de um detector por ionização de chama (FID) (Adaptado de: CHROMATOGRAPHY ONLINE, 2017).....	21
Figura 9. Esquema do Espectrômetro de massa que é acoplado ao GC (Adaptado de: WOO e THET, 2015). ....	22
Figura 10. Fervura do mosto cervejeiro em panela de aço inox.....	36
Figura 11. Ensaio de fermentação visto pelo interior do incubador.....	38
Figura 12. Incubador rotativo com controle de temperatura durante o ensaio de fermentação a 23 °C.....	38
Figura 13. Fotografia da etapa de maturação pós-fermentação conduzida na geladeira acoplada a um controlador de temperatura.....	39
Figura 14. Refratômetro portátil e escala de medição para leitura do grau brix utilizado nos experimentos. ....	40
Figura 15. Fotografia de células com 100% de viabilidade, no início da fermentação, visualizadas em um microscópio eletrônico com o aumento de 400 vezes (Ensaio do Ponto Central).....	41
Figura 16. Fotografia de células mortas identificadas com o método colorimétrico com azul de metileno, visualizadas em um microscópio eletrônico com o aumento de 400 vezes, após um mês de ensaio. ....	41
Figura 17. Fórmulas estruturais dos compostos identificados no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa.....	46
Figura 18. Perfis de concentração do etanol nas diferentes condições de fermentação (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).....	51
Figura 19. Rotas metabólicas e genes utilizados para regulação celular, utilizando fontes de carbono não fermentescíveis (TURCOTTE et al., 2009). ....	52
Figura 20. Concentrações do acetaldeído ao longo dos ensaios de fermentação em diferentes condições (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10). ....	53

Figura 21. Perfis de concentração para o álcool fenetílico (FEA) nas diferentes condições de fermentação realizadas (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).....	54
Figura 22. Concentração do 2-metil-1-butanol (2m1b) ao longo das fermentações nas diferentes condições experimentais utilizadas (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10)....	56
Figura 23. Perfil de concentração do triptofol nas diferentes condições de fermentação realizadas (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).....	57
Figura 24. Valores de concentração para o acetato de isopentila (AI) ao longo dos ensaios de fermentação em apenas três (F01, T=23°C e °Br=15; F03, T=19°C e °Br=12,5 e F04, T=15°C) das cinco diferentes condições utilizadas. ....	59
Figura 25. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração do etanol nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.....	63
Figura 26. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de 2m1b nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.....	64
Figura 27. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de acetaldeído nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.....	65
Figura 28. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de triptofol nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.....	65
Figura 29. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de álcool fenetílico (FEA) nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.....	66
Figura 30. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de acetato de isopentila (AI) nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.....	66
Figura 31. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de etanol em todas as condições de fermentação. ....	67
Figura 32. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de 2-metil-1-butanol em todas as condições de fermentação.....	68
Figura 33. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de acetaldeído em todas as condições de fermentação.....	68
Figura 34. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de triptofol em todas as condições de fermentação.....	68
Figura 35. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de álcool fenetílico em todas as condições de fermentação.....	69
Figura 36. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de acetato de Isopentila em todas as condições de fermentação.....	69
Figura 37. Sobreposição dos perfis de concentração do etanol e do 2m1b para a condição F01. ....	71

Figura 38. Sobreposição dos perfis de concentração do etanol e do 2m1b para a condição F04. ....	72
Figura 39. Variação dinâmica dos coeficientes de correlação entre o etanol e o 2m1b. ....	73
Figura 40. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para a concentração de etanol. ....	80
Figura 41. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o etanol.....	81
Figura 42. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o 2m1b.....	82
Figura 43. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o 2m1b. ....	83
Figura 44. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o acetaldeído. ....	84
Figura 45. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o acetaldeído. ....	85
Figura 46. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o triptofol.....	86
Figura 47. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o triptofol. ....	87
Figura 48. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o álcool fenético.....	88
Figura 49. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o álcool fenético. ....	89
Figura 50. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o acetato de isopentila. ....	90
Figura 51. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o acetato de isopentila.....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limites de detecção sensoriais para os metabólitos voláteis estudados no presente trabalho (ASBC, 2015).....	15
Tabela 2. Variáveis independentes do processo e respectivos níveis experimentais. ....	33
Tabela 3. Matriz de planejamento experimental. ....	33
Tabela 4. Condições dos métodos cromatográficos utilizados para caracterizar o etanol e os demais metabólitos voláteis. ....	43
Tabela 5. Valores medidos do °Br ao longo das fermentações.....	48
Tabela 6. Densidade específica do mosto corrigida. ....	49
Tabela 7. Valores de concentração final para os metabólitos voláteis estudados nas etapas de fermentação e maturação. ....	61
Tabela 8. Valores de correlação entre o etanol e o 2m1b obtidos das matrizes de correlação diárias da condição F01. ....	70
Tabela 9. Valores de correlação entre o etanol e o 2m1b obtidos das matrizes de correlação diárias da condição F04. ....	71
Tabela 10. Matrizes de correlação geral para as condições F01 e F02. ....	73
Tabela 11. Matrizes de correlação geral para as condições de F03 e F04.....	74
Tabela 12. Matriz de correlação geral para a condição F05.....	74
Tabela 13. Matriz de correlações global entre as variáveis. ....	75
Tabela 14. Análise das direções principais para as condições de fermentação F01 e F02, considerando todas as medidas disponíveis.....	76
Tabela 15. Análise das direções principais para as condições de fermentação F03 a F05, considerando todas as medidas disponíveis.....	76

## NOMENCLATURA

<b>ABRABE</b>	Associação Brasileira de Bebidas
<b>ASBC</b>	American Society of Brewing Chemists
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>GCFID</b>	Cromatógrafo gasoso acoplado a um detector por ionização de chama
<b>GCMS</b>	Cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massa
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina
<b>NADH</b>	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\varepsilon$	Erro aleatório
$\alpha$	Grau de liberdade
$V$	Matriz de covariâncias dos erros experimentais
$B$	Matriz de sensibilidades
$\bar{X}$	Média amostral
$\mu_x$	Média verdadeira
$N$	Número de réplicas
$a_i, \beta_i$	Parâmetros do modelo
$P_{AC}$	Probabilidade acumulada
$T$	Temperatura
$\sigma_x^2$	Variância
$S_x$	Variância amostral
$F$	Variável normalizada F de Fisher
$t$	Variável normalizada t de Student
$y$	Variável resposta
$y^*$	Vetor de predições do modelo
$y^e$	Vetor dos valores experimentais

# 1. INTRODUÇÃO

Há mais de 10.000 mil anos, o homem conheceu o processo de fermentação provavelmente de maneira acidental e as primeiras bebidas alcoólicas começaram a ser produzidas. Acredita-se que um pedaço de um pão de centeio estragou e apresentou um aroma e sabor agradável, fruto da fermentação alcoólica, sendo posteriormente misturado na água, gerando a cerveja. Não se sabe ao certo a origem das primeiras cervejas. Porém, acredita-se que a prática da cervejaria tenha se originado na região da Mesopotâmia, onde, como no Egito, a cevada cresce em estado selvagem (AQUARONE, 1983)(KUNZE e MIETH, 2004).

Desde a antiguidade até os dias atuais, a cerveja é uma das mais importantes bebidas alcoólicas, ganhando cada vez mais espaço no mercado e abrangendo um enorme número de consumidores no Brasil e no mundo. O Brasil produz, em volume, 8,5 bilhões de litros anuais, perdendo apenas para a China (27 bilhões de litros/ano), Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano), Alemanha (10,5 bilhões de litros/ano) e Rússia (9 bilhões de litros/ano), sendo o consumo per capita no Brasil o nono maior do mundo, com uma média de 47,6 litros/ano por habitante (CERVBRASIL, 2017).

As cervejas industriais sempre tiveram maior destaque no mercado. Porém, nos últimos anos a cerveja artesanal vem ganhando espaço e estima-se que essas cervejas especiais, que representam menos de 1% do mercado nacional, cheguem a representar 2% em uma década (ABRABE, 2014).

As cervejas artesanais são produzidas principalmente visando a maior qualidade do produto final, ou seja, cervejas mais encorpadas, feitas com produtos diferenciados e nobres, tornando-se mais complexas que as tradicionais. A produção da cerveja passa por diversas etapas, como preparo do mosto, fermentação e maturação, que podem variar de acordo com o produto final desejado. A etapa mais importante do processo é a fermentação, um processo biológico pelo qual as leveduras crescem e se reproduzem através do consumo de açúcares fermentescíveis. Como resultado desse metabolismo, energia é liberada e há a

formação de etanol, gás carbônico e outros metabólitos secundários, que ajudam a compor o aroma da cerveja (BARTH, 2013).

Dessa forma, a levedura empregada na produção da cerveja torna-se um fator importante no processo, já que é o microrganismo responsável pela etapa fundamental (PIRES *et al.*, 2014). As leveduras atualmente empregadas na fabricação da cerveja artesanal são geralmente importadas. Assim, vários estudos para o isolamento, cultivo e avaliações do potencial fermentativo têm sido realizados, devido à grande variedade da microbiota nacional, ainda pouco explorada para esse tipo de aplicação (WHITE e ZAINASHEFF, 2010).

Estudos para identificar e quantificar os metabólitos secundários produzidos por leveduras isoladas são pouco encontrados na literatura, principalmente quando associados com análises estatísticas e modelos estatísticos para melhor entendimento das rotas metabólicas por meio das quais esses compostos são gerados. Análises microcinéticas de reações catalíticas vêm sendo empregadas com sucesso e mostram que os erros experimentais seguem padrões que podem descrever não somente as flutuações experimentais, mas também a cinética do processo (LARENTIS *et al.*, 2003).

## **1.1. OBJETIVO**

O objetivo deste trabalho é avaliar como mudanças nas variáveis do processo influenciam a formação dos metabólitos voláteis gerados pela fermentação de uma levedura isolada da jabuticaba. O microrganismo utilizado também é estudado, a fim de avaliar a sua capacidade fermentativa.

### **1.1.1. Objetivos específicos**

Os objetivos específicos almejados deste trabalho são:

- Identificar o tipo da levedura utilizada e avaliar seu potencial fermentativo para produção de cervejas artesanais.

- Estudar a influência das variáveis do processo de fermentação, temperatura e °Brix inicial, sobre formação dos metabólitos voláteis selecionados, através de um planejamento fatorial;
- Desenvolver um modelo empírico para representar o processo;
- Obter informações sobre a cinética local da formação dos metabólitos gerados.

## **1.2. ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO**

Esta dissertação foi organizada em seis capítulos. O Capítulo 1 apresenta uma introdução genérica do processo de fabricação de cerveja, citando a motivação e importância do trabalho, além de destacar os objetivos gerais e específicos do estudo. O Capítulo 2 apresenta uma fundamentação teórica e um estudo da arte, para contextualizar o leitor sobre o tema e também destacar alguns dos trabalhos mais importantes encontrados na literatura e relacionados à fermentação de cervejas. Abordam-se as leveduras isoladas, a formação de metabólitos voláteis e os efeitos sobre como as variáveis do processo afetam a formação desses produtos secundários. O Capítulo 3 descreve todas as metodologias experimentais, materiais e equipamentos utilizados na pesquisa. Em seguida, no Capítulo 4, os resultados obtidos ao longo dos experimentos são mostrados e discutidos. As conclusões, além de sugestões para trabalhos posteriores, são apresentadas no Capítulo 5. Por fim, o Capítulo 6 compreende as referências bibliográficas consultadas para elaboração deste trabalho.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo tem a finalidade de apresentar conceitos sobre cerveja artesanal e respectivas etapas de produção. A etapa mais importante, a fermentação, é destacada e os parâmetros que mais a influenciam são apresentados. A importância da levedura e dos metabólitos voláteis do processo também são explicados. À medida que os conceitos teóricos são expostos, os trabalhos mais relevantes encontrados na literatura são citados.

### 2.1. A CERVEJA ARTESANAL

A cerveja é uma das bebidas mais antigas e amplamente consumidas pela humanidade, sendo obtida da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro pela ação de leveduras. A cerveja é uma bebida não destilada, carbonatada e que possui em geral baixo teor alcoólico, entre 3 a 8%. O mosto é composto basicamente de malte de cevada, água e lúpulo, matérias-primas essenciais para fabricação da cerveja, e pela levedura (SCHMIDELL *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2008).

Em grandes cervejarias, outras matérias amiláceas (milho, arroz, trigo, entre outras) podem ser utilizadas para complementar o malte com a finalidade de reduzir o custo de produção. Entretanto, segundo a legislação brasileira, a bebida deve possuir uma proporção de malte de cevada de no mínimo 45% em peso, sobre o mosto cervejeiro (BRASIL, 2009). Essa adição pode modificar o sabor final do produto, tornando a cerveja mais aguada, fraca, o que pode não agradar o paladar do consumidor.

Neste contexto as cervejas artesanais aparecem como uma alternativa. Essas cervejas, como introduzidas anteriormente, são compostas geralmente com o malte de cevada puro e matérias-primas nobres, o que garante características individualizadas e um sabor mais marcante. Essas bebidas são produzidas de maneira tradicional, por pequenas cervejarias e têm ganhado cada vez mais espaço no mercado cervejeiro (GAROFALO *et al.*, 2015).

O processo da produção da cerveja artesanal é composto por várias etapas, como a moagem do malte, a mosturação, a fervura, o resfriamento, a fermentação, a maturação e o envase. A moagem consiste em uma cuidadosa trituração dos grãos de cevada, para liberar o amido e proteínas contidos no grão, sem danificar a casca, que auxilia na filtração (BARTH, 2013). O grão moído segue para mosturação (ou brassagem), quando o grão é colocado em água a uma temperatura elevada o suficiente para favorecer a ação das amilases ( $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase). Essas enzimas agem convertendo o amido contido no grão em açúcares de menor massa molar (maltose, glicose e maltriose). A etapa dura aproximadamente uma hora e forma o mosto para fermentação da cerveja. Os açúcares gerados são utilizados pelas leveduras no processo fermentativo (SIQUEIRA *et al.*, 2008).

A etapa seguinte é a fervura do mosto. O mosto é fervido junto com o lúpulo por uma a duas horas, para esterilização, eliminando microrganismos contaminantes, e inativação das enzimas para a fermentação. Moléculas do lúpulo, responsáveis pelo sabor e aroma da cerveja, são extraídas e compostos indesejáveis são evaporados (BARTH, 2013).

A próxima etapa consiste em resfriar o mosto de forma rápida, evitando contaminação, para alcançar uma temperatura favorável à fermentação, garantindo que a levedura seja inoculada sem comprometer a viabilidade das células. Segundo TAKAHASHI e OHNO (1986), o mosto deve ser aerado a fim de prover oxigênio para o crescimento celular no estágio inicial da fermentação. Com a oxigenação, a levedura é capaz de se reproduzir e realizar seu metabolismo de forma adequada.

A fermentação é a etapa mais importante de todo o processo de produção de cerveja e será tratada com mais detalhes no tópico a seguir, pois é a etapa foco que constitui o presente trabalho. Um esquema do processo geral de produção de cerveja artesanal é apresentado na figura 1.

Após a fermentação, a cerveja é armazenada a baixas temperaturas para que ocorra a decantação das partículas, resíduos em suspensão e de boa parte das leveduras contribuindo assim, para melhoria do sabor, aroma e clarificação da cerveja. A etapa final consiste no envase do produto.



Figura 1. Esquema do processo cervejeiro (Adaptado de: TRINDADE, 2014).

## 2.2. A FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA

A fermentação, como citado anteriormente, é um processo biológico para crescimento e reprodução celular. A glicose é uma das substâncias mais empregadas pelos microrganismos, sendo utilizada como ponto de partida para fermentação, que ocorre em condições anaeróbicas (AMORIM e LEÃO, 2005).

A fermentação ocorre no citosol da célula e compreende uma série de reações enzimáticas. A primeira etapa de reações é a glicólise. Nesta etapa, cada molécula de glicose é oxidada e duas moléculas de piruvato (ácido pirúvico) são obtidas, com liberação de hidreto e energia (duas moléculas de ATP), por meio de uma série de reações químicas. O agente oxidante é o  $\text{NAD}^+$ , que se liga ao hidreto formando  $\text{NADH}_2$ .

A segunda etapa compreende a redução do piruvato. O ácido é descarboxilado, liberando  $\text{CO}_2$  e formando um acetaldeído, que posteriormente reage com o  $\text{NADH}_2$  para formar o álcool etílico, regenerando o  $\text{NAD}^+$ . O processo pode ser melhor compreendido na figura 2.

Os processos fermentativos podem ser classificados de acordo com a maneira através da qual o substrato é adicionado e o produto retirado. Existem três tipos básicos de processos fermentativos: contínuo, batelada alimentada e batelada, sendo esse último o método utilizado para a produção de cervejas artesanais..

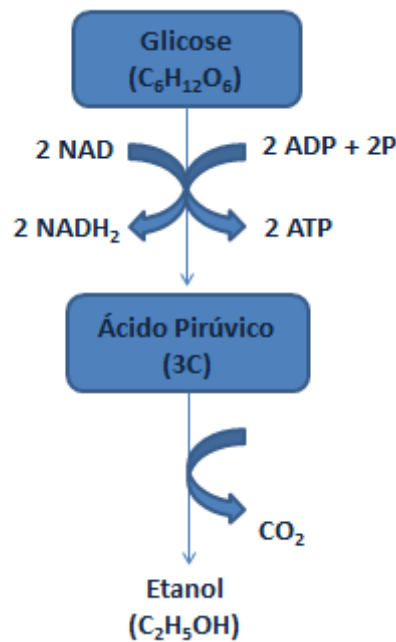


Figura 2. Esquema da fermentação alcoólica de leveduras utilizando a glicólise como rota metabólica.

### **2.2.1. Processo em batelada (descontínuo)**

No processo em batelada todos os nutrientes são adicionados antes do início do processo, além de alguns químicos adicionais caso seja necessário (para controle de pH e °Br, por exemplo). O volume durante a fermentação permanece essencialmente constante. O processo ocorre até que a fermentação chegue a seu estado final e o produto seja retirado.

No que se refere à manutenção e assepsia, o processo descontínuo é considerado o mais seguro, pois, ao início de cada batelada, os equipamentos devem ser esterilizados assim como o novo meio de cultura (mosto cervejeiro), recebendo um novo inóculo que



deve ser submetido a todos os controles necessários para assegurar a presença única do microrganismo responsável pelo processo (SCHMIDELL *et al.*, 2001).

### **2.2.2. Variáveis que influenciam na fermentação**

A duração de uma fermentação, bem como a formação dos metabólitos voláteis, depende das condições em que o processo ocorre. Mudanças nos fatores químicos, físicos e microbiológicos afetam o rendimento do processo fermentativo, a conversão dos açúcares em etanol e em substâncias secundárias, pois interferem nas rotas metabólicas das leveduras, gerando características únicas na cerveja (PEDDIE, 1990).

Dentre os fatores mais estudados por influenciar a fermentação alcoólica estão a temperatura, a quantidade de açúcares fermentescíveis no meio, o pH, a quantidade de leveduras inoculadas e a cepa de levedura utilizada. Dependendo dos valores escolhidos para essas variáveis, elas podem gerar um ambiente estressante para o crescimento da levedura, como os altos teores alcóolicos, a temperatura elevada, a acidez acentuada, devendo assim ser estudados para garantir o melhor controle sobre o processo (ALVES, 1994).

Entretanto, quando tratado como variável, o inóculo muda a cinética da fermentação e afeta bastante o tempo, dificultando a análise das demais variáveis. A quantidade de células inoculadas é, geralmente, cerca de  $1 \times 10^6$  cel/mL/°Br, valor comumente utilizado para produção de cervejas (JONES, 2007).

Neste trabalho, as variáveis manipuladas serão apenas a temperatura e o grau brix (medida do teor de açúcares). Essas variáveis foram selecionadas devido ao fato de serem bastante estudadas na literatura como fatores importantes para a fermentação alcoólica da cerveja. Além disso, CHARANEK (2016) em seu estudo, concluiu que dentre as quatro variáveis citadas a temperatura e o °Br inicial foram mais significativas para construção do modelo empírico da fermentação de sua levedura. A facilidade de manipulação desses parâmetros pela indústria cervejeira também foi levada em conta.

### 2.2.2.1. Temperatura

A temperatura do sistema afeta o crescimento da levedura e sua taxa metabólica. Estudos realizados por MERRIT (1966) já mostravam que à medida que a temperatura aumenta sem aeração, não excedendo um limite de 30 °C, o crescimento da levedura e a formação de etanol eram favorecidos. Caso o meio fosse oxigenado, esse limite subiria para 35 °C, com uma taxa de produção máxima de etanol em uma temperatura de aproximadamente 25 °C.

Em outro estudo posterior, foi estabelecida uma faixa ótima de temperatura entre 25 e 36 °C. Acima da temperatura limite superior, o efeito inibitório do etanol sobre a levedura é amplificado, os metabólitos voláteis formados podem evaporar, pode haver contaminação bacteriana e pode ocorrer o aparecimento de substâncias indesejáveis. Já em temperaturas inferiores, o processo de fermentação torna-se muito lento (MENEZES, 1980). Temperaturas elevadas também são indicadas para reduzir a formação de ésteres e ácidos graxos, metabólitos comumente presentes em cervejas (STARR e PARKS, 1962).

Para a produção de etanol, estudos realizados por WIN *et al.* (1995) concluíram que a temperatura de 30 °C era a ideal, utilizando amido de mandioca como fonte de carbono. Porém nos anos seguintes, é possível encontrar vários trabalhos que relatam temperaturas ótimas entre de 28 e 32 °C para a formação do álcool, utilizando melaço de cana como fonte de açúcares (ECHEGARAY *et al.*, 2000). Conclui-se assim que há uma faixa de temperaturas adequada para a fermentação alcoólica e que pequenas mudanças de temperatura dentro dessa faixa não geram consequências negativas ou perdas apreciáveis para o produto final.

A temperatura, em sinergia com outros fatores, como pH e a presença de etanol no meio, também afeta a viabilidade celular. Leveduras do gênero *Saccharomyces*, mesmo sendo resistentes às altas temperaturas, quando colocadas em um meio com pH baixo e etanol concentrado tiveram sua viabilidade reduzida (DA SILVA FILHO *et al.*, 2005).

Uma pesquisa realizada por HIRALAL *et al.* (2014) mostra como de forma individual a temperatura e o pH influenciam o crescimento celular e a formação de

etanol e ésteres. Na fermentação em uma temperatura de 22,5 °C, a taxa de formação dos metabólitos e a densidade celular foram maiores, quando comparadas a fermentações conduzidas em temperaturas inferiores de 14 e 18 °C. Para o pH, no valor médio igual a 5, houve uma maior formação de etanol e maior crescimento celular, quando comparados aos valores obtidos nos limites inferior e superior iguais a pH 3 e 7. O pH mais elevado favoreceu a formação de ésteres.

Temperaturas mais elevadas, dentro da faixa citada, tornam o processo fermentativo mais rápido e levam a maior produção de etanol. O potencial fermentativo de uma levedura isolada de uvas foi avaliado em duas condições de temperaturas diferentes, 14 e 20 °C, obtendo-se na temperatura mais alta uma maior atividade fermentativa e maior formação de etanol (ESTELA-ESCALANTE *et al.*, 2016).

Segundo KODAMA *et al.* (2001), o aumento da temperatura causa um aumento da taxa de transporte dos aminoácidos, como leucina e isoleucina, para o interior da célula, favorecendo a rota de Ehrlich e conseqüentemente a formação de álcoois superiores.

#### **2.2.2.2. pH**

O pH é outra variável fundamental, quando se estuda a fermentação alcoólica. MENEZES (1980) observou que a faixa ideal de pH para realizar a fermentação é de 4,0 a 5,0. Porém, valores de pH inferiores, por volta de 3,7, também podem ser encontrados na literatura (BRIGGS *et al.*, 2004). O pH utilizado durante o processo afeta as enzimas extracitoplasmáticas, como a invertase, e a estrutura da membrana celular, devido à capacidade tamponante intracelular das leveduras (ABRAHÃO-NETO *et al.*, 1996).

Durante a fermentação, em um meio não tamponado, o valor do pH cai rapidamente nos primeiros momentos. A acidificação do meio é resultado da atividade de respiração do microrganismo, quando o meio é aerado, que libera prótons para o meio extracelular. Por sua vez, o controle dessa liberação é feito pelo pH estabelecido no meio externo. O mecanismo ocorre devido ao equilíbrio necessário na concentração de prótons extra e intracelular (DE MORAIS, 1986). Após essa etapa, o pH cai

lentamente, chegando a valores próximos de 4,0 a 3,5 no fim da fermentação (AMORIM e LEÃO, 2005).

Como citado anteriormente, HIRALAL *et al.* (2014) estudou a influência do pH sobre o crescimento celular e a taxa de formação de etanol e de ésteres. Um pH mediano, ao redor de 5,0, foi o valor ótimo para o crescimento celular e para o aumento da concentração de etanol no meio. Já para a formação de ésteres, concluiu-se que o maior valor de pH, no caso 7,0, resultava em maior atividade do álcool acetil transferase (AATase), gerando maior concentração de ésteres no meio.

BAMFORTH e KANAUCHI (2004) relatam um pH ótimo de 3,5 para uma menor formação de diacetil no meio. Conclui-se que a reação de descarboxilação oxidativa de  $\alpha$ -acetolactato (redução a diacetil) era favorecida com a diminuição do pH do meio, ocorrendo mais acentuadamente no fim da fermentação.

ESTELA-ESCALANTE *et al.* (2016) utilizaram um pH por volta de 4,8 para avaliar o potencial de uma levedura isolada de uvas e observaram que durante a fermentação da levedura isolada o pH diminuiu pouco ao longo do processo fermentativo. Considerando a levedura uma boa opção para fermentar cervejas já que não há acidificação acentuada do meio.

### **2.2.2.3. Fonte de Carbono**

Para crescimento e reprodução, as leveduras utilizam preferencialmente açúcares, em detrimento de outras fontes de carbono. A seleção e quantidades desses açúcares são fatores cruciais no processo fermentativo. Alguns açúcares podem ser prejudiciais ao desenvolvimento das leveduras, reduzindo a velocidade de crescimento e causando repressão catabólica da síntese de algumas enzimas. Açúcares fermentescíveis favorecem a formação de proteínas que impulsionam a fermentação, reprimem a formação de enzimas da cadeia respiratória e inativam as enzimas da gluconeogênese. (LILLIE e PRINGLE, 1980).

A glicose é o açúcar mais utilizado como fonte de carbono por esses microrganismos, sendo que a concentração de açúcares no meio é uma ferramenta de

regulação dos metabolismos. Cada microrganismo transporta e absorve a glicose de maneira diferente. Para algumas espécies, a glicose, além de ser fonte de carbono, regula o mecanismo global de crescimento da célula, podendo limitar ou favorecer o catabolismo durante a fermentação (REIFENBERGER *et al.*, 1997).

Uma concentração elevada de açúcar no meio inibe o crescimento da levedura e diminui a concentração de células no meio. Como consequência, a taxa de fermentação é reduzida antes da formação de quantidade significativa de etanol, necessária para o produto final que se deseja obter (YE *et al.*, 1999). Assim, é importante avaliar a quantidade de açúcar no meio, necessária para favorecer o crescimento e as rotas metabólicas fermentativas. Poucos estudos com essa finalidade têm sido encontrados na literatura.

### **2.2.3. A levedura**

As leveduras são os agentes da fermentação alcoólica. Sendo assim, as leveduras são os microrganismos mais importantes pela obtenção do álcool e dos metabólitos responsáveis pelo sabor e aroma da cerveja. A formação e concentração desses produtos durante a fermentação dependem principalmente das rotas metabólicas que a levedura utiliza. Os microrganismos mais utilizados para a produção de cervejas são do gênero *Saccharomyces*, por metabolizar de forma bastante eficiente os componentes do mosto e gerarem um produto final com qualidade e estabilidade sensorial (BENTO e DE ALMEIDA, 2006).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são seres unicelulares e que pertencem à classe dos eucariotas, ou seja, providos de um núcleo individualizado. Esse gênero de leveduras inclui variadas espécies consideradas capazes de produzir os metabólitos primários e secundários fundamentais na cerveja. Por isso as cepas cervejeiras são divididas em duas categorias, de acordo com algumas características que as diferenciam: são as leveduras do tipo Ale e as leveduras do tipo Lager (BOKULICH e BAMFORTH, 2013).

As leveduras Ale são cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Essa espécie é bastante diversificada e tem sido isolada em inúmeras localidades diferentes em todo o

mundo. As leveduras do tipo Ale são também conhecidas como leveduras de alta fermentação, pois tendem a migrar para superfície do vaso fermentador podendo ser facilmente recolhidas e reutilizadas. Essas leveduras preferem temperaturas entre 15 a 20 °C, sendo mais rápidas que as Lager no processo fermentativo, que pode durar de 3 a 5 dias. A temperatura de cultivo, para crescimento de uma levedura Ale, pode chegar a 37 ° C (BELLOCH *et al.*, 1998).

As leveduras conhecidos como Lager, são leveduras de baixa fermentação, pelo fato de não emergirem para superfície em qualquer condição de fermentação. São em geral da espécie *S. pastorianus*, organismos mais complexos que as Ale (BARNETT, 1992). O crescimento dessas cepas se dá a temperaturas mais baixas, não havendo crescimento em temperaturas acima de 34 °C. A faixa de temperaturas para uma boa fermentação com as leveduras do tipo Lager é de 8 a 15 °C, com duração de 7 a 10 dias (BELLOCH *et al.*, 1998).

Fatores bioquímicos, como a presença dos genes MEL nas cepas de *S. pastorianus*, responsáveis pela produção de uma enzima extracelular,  $\alpha$ -galactosidase, também ajudam a diferenciar uma levedura Ale de uma Lager. Essa enzima permite a utilização do dissacarídeo glicose-galactose, metabolizando a melibiose (açúcar residual formado), algo que as leveduras Ale são incapazes de fazer (TUBB e LILJESTROM, 1986).

As leveduras do tipo Ale podem ser isoladas de inúmeras fontes diferentes. No Brasil, a biodiversidade natural de leveduras é enorme e ainda inexplorada para esse tipo de aplicação. Isolar linhagens nacionais para a produção de cerveja não só contribui para o desenvolvimento científico e tecnológico do setor, como também confere mais autonomia e independência ao mercado cervejeiro, pois atualmente a maioria das leveduras utilizadas para esse fim no Brasil é importada.

Vários estudos vêm sendo realizados e mostram variabilidades significativas no metabolismo de *S. cerevisiae*. Sendo assim, conclui-se que a cepa escolhida para conduzir o processo fermentativo afeta consideravelmente a qualidade do produto final. Daí, a importância de estudá-las. A levedura utilizada no processo também é responsável por alguns metabólitos específicos, como ésteres e álcoois, devido às mudanças genéticas de uma linhagem para a outra (PIRES *et al.*, 2014).

O potencial fermentativo de leveduras isoladas da casca de uvas maduras foi estudado por ESTELA-ESCALANTE *et al.* (2016). Os autores analisaram a fermentação em duas temperaturas diferentes, com composições de mosto diferenciadas, avaliando a formação de etanol e a viabilidade celular e fazendo testes sensoriais e de sedimentação. Os autores concluíram que a levedura isolada produz cerveja artesanal, por conta de análise sensorial e da capacidade de fermentar açúcares e produzir etanol.

### 2.3. METABÓLITOS VOLÁTEIS

A etapa de fermentação é muito importante para a formação das características organolépticas da cerveja. Nesta etapa, além do etanol e do gás carbônico, as leveduras também produzem uma série de metabólitos em baixas concentrações, responsáveis pelo sabor e aroma do produto final. Essas substâncias são ésteres, ácidos e álcoois, que quando combinadas, determinam o sabor e o aroma característico da cerveja.

Todas as substâncias responsáveis pela ativação do sabor e aroma na cerveja precisam ser mantidas até certo nível limite (limite de detecção sensorial, LD) para os padrões de consumo. Alguns produtos secundários formados podem contribuir negativamente para o sabor e aroma da cerveja, sendo por isso conhecidas como “*off-flavor*”, como acetaldeído e triptofol. Alguns ésteres e álcoois, quando presentes em excesso, podem atrapalhar o equilíbrio das substâncias que geram o sabor característico da cerveja (PIRES *et al.*, 2014), sendo por isso indesejáveis. Alguns valores de LD para os metabólitos estudados podem ser encontrados na Tabela 1.

Muitos dados já foram reunidos na literatura, principalmente na área da genética, permitindo descrever de forma detalhada cada rota metabólica usada para formação dos compostos citados. Álcoois superiores, por exemplo, são formados tanto pelo anabolismo como pelo catabolismo de aminoácidos. Já os ésteres são formados pela condensação enzimática de ácidos orgânicos e álcoois (PIRES *et al.*, 2014).

Tabela 1. Limites de detecção sensoriais para os metabólitos voláteis estudados no presente trabalho (ASBC, 2015).

COMPOSTO QUÍMICO	CLASSE	LD (mg/L)
Etanol	Álcool	17000
Álcool Fenetílico	Álcool	40
2-metil-1-butanol	Álcool	65
Triptofol	Álcool	414
Acetato de Isopentila	Éster	0,6
Acetaldeído	Aldeído	25

A principal rota metabólica utilizada pelas leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, para formação do etanol e do acetaldeído a partir da glicose, é a super-rota de fermentação da glicose, ilustrada na Figura 3. Essa rota inicia-se com a glicólise, que quando utilizada pelas leveduras, é mais conhecida como Rota de Embden-Meyerhof. O início desta etapa ocorre quando os grupos fosfatos, vindos da molécula de ATP, são acoplados à molécula de açúcar em duas posições. Em seguida, os açúcares formados por seis carbonos são quebrados em dois açúcares de três átomos de carbono, cada um contendo um grupo fosfato (BARTH, 2013).

Um segundo grupo fosfato pode ser adicionado a essas moléculas, porém dessa vez ligado a um grupo metila (e não a um grupo hidroxila, como anteriormente), produzindo água como produto secundário. Por fim, as duas moléculas de fosfato, de cada açúcar, são acopladas ao ADP, produzindo duas moléculas de ATP e duas moléculas de água. Assim, o açúcar é oxidado e o piruvato (ácido pirúvico) é formado (BARTH, 2013).

A próxima etapa da super-rota compreende a formação do acetaldeído e etanol. Uma molécula de CO<sub>2</sub> é liberada do ácido pirúvico (descarboxilação) reduzindo o composto a uma cadeia com apenas dois carbonos, gerando o acetaldeído. O acetaldeído, por sua vez, recebe dois hidrogênios provindos do NAD<sup>+</sup> em suas duplas ligações e transforma-se em etanol. Toda essa Rota é conhecida e catalogada pelo banco de genoma de leveduras (*Yeast Genome*) e pode ser mais bem compreendida a partir do esquema da Figura 3 (DIAS, 2001).



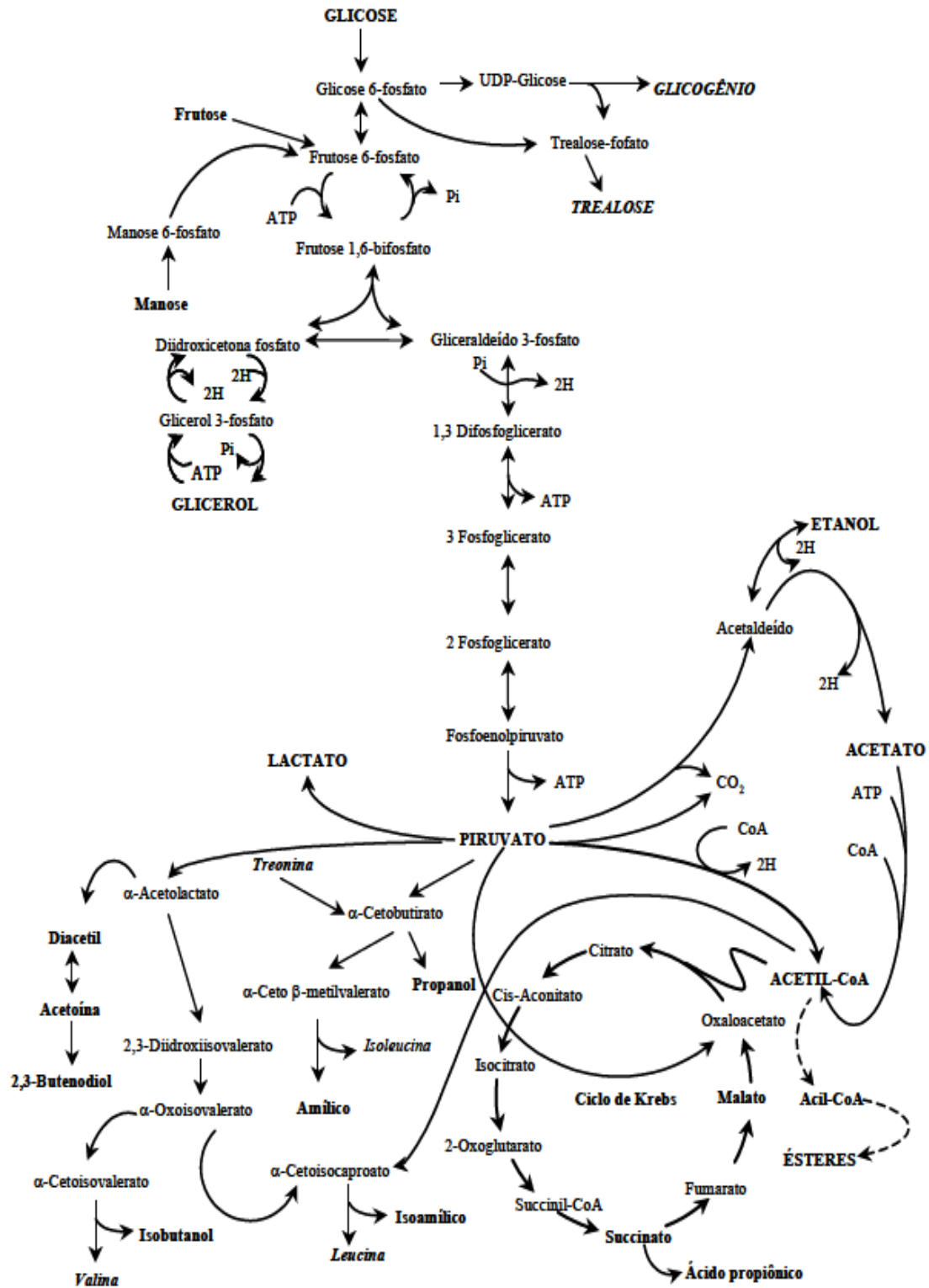


Figura 3. Super-rota metabólica para formação dos produtos da fermentação a partir da glicose (DIAS, 2001).

Os álcoois superiores são as substâncias organolépticas mais abundantes na cerveja. A levedura absorve o grupo amina dos aminoácidos, presentes no mosto. O restante ( $\alpha$ -cetoácidos) participa de uma série de reações, mostradas com mais detalhe na Figura 4, formando os álcoois superiores. Essa rota é conhecida como rota de Ehrlich, nome do cientista que associou a semelhança entre a isoleucina (aminoácido) e o álcool amílico (álcool superior também conhecido como 2-metil-1-butanol) e entre a leucina e o álcool isoamílico (3-metil-1-butanol) (PIRES *et al.*, 2014). Apesar de esse caminho ser o mais conhecido e estudado atualmente, álcoois superiores também são formados durante a biossíntese inicial dos aminoácidos, pela rota anabólica (OSHITA *et al.*, 1995).

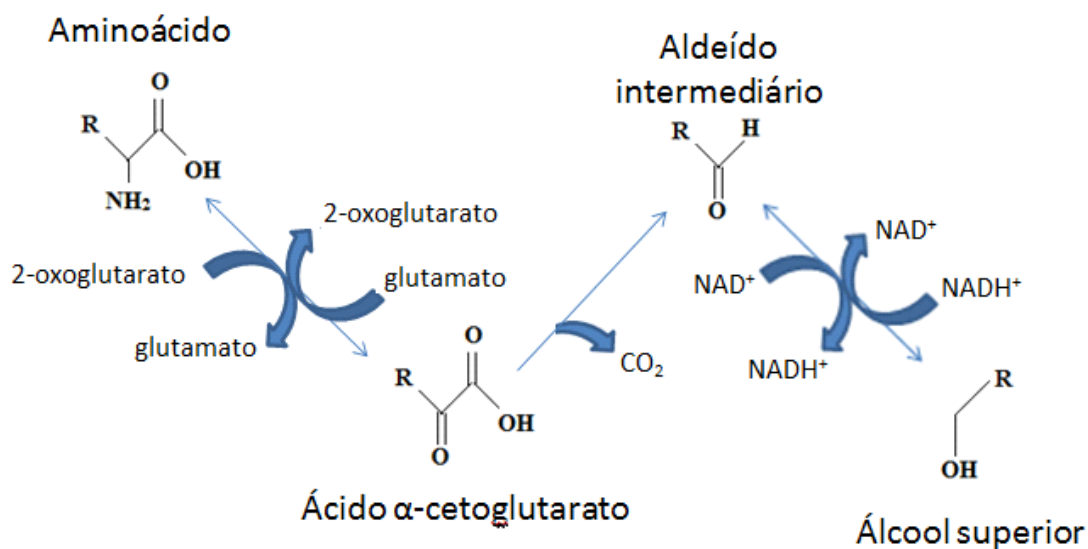


Figura 4. Rota metabólica para a formação de álcoois superiores, como 2-metil-1-butanol (HAZELWOOD *et al.*, 2008).

O álcool fenetílico é outro exemplo de álcool formado por meio da degradação metabólica de aminoácidos via rota de Ehrlich. O mecanismo para sua formação engloba a série de reações mostradas na Figura 5 (ETSCHMANN *et al.*, 2003).

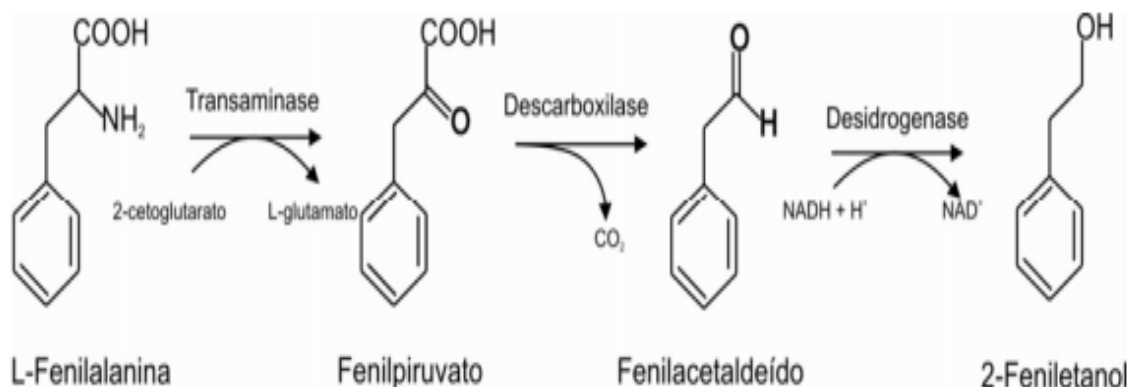


Figura 5. Rota de Ehrlich para a formação do Álcool fenetílico ou 2-feniletanol (ETSCHMANN et al., 2003).

Os ésteres são substâncias formadas em quantidades bem pequenas, porém causam grande interferência no sabor e aroma final da cerveja. Esses componentes são formados na fase primária da fermentação pela condensação enzimática de ácidos orgânicos e álcoois. A reação ocorre no citoplasma da célula, mas os metabólitos formados são logo levados para o meio, pelo fato da levedura ser lipofílica (PIRES *et al.*, 2014).

Os ésteres voláteis são divididos em dois grandes grupos principais, sendo eles os ésteres de acetato e os ésteres de etila. O primeiro é composto por ésteres sintetizados a partir da reação do ácido acético com o etanol, com um álcool superior ou com um ácido orgânico. Para a formação do segundo grupo, o etanol é responsável pelo radical do álcool e a parte do ácido é formada por um ácido graxo de cadeia média. As rotas para formação do primeiro grupo, que engloba componentes estudados neste trabalho, estão ilustradas na Figura 6.

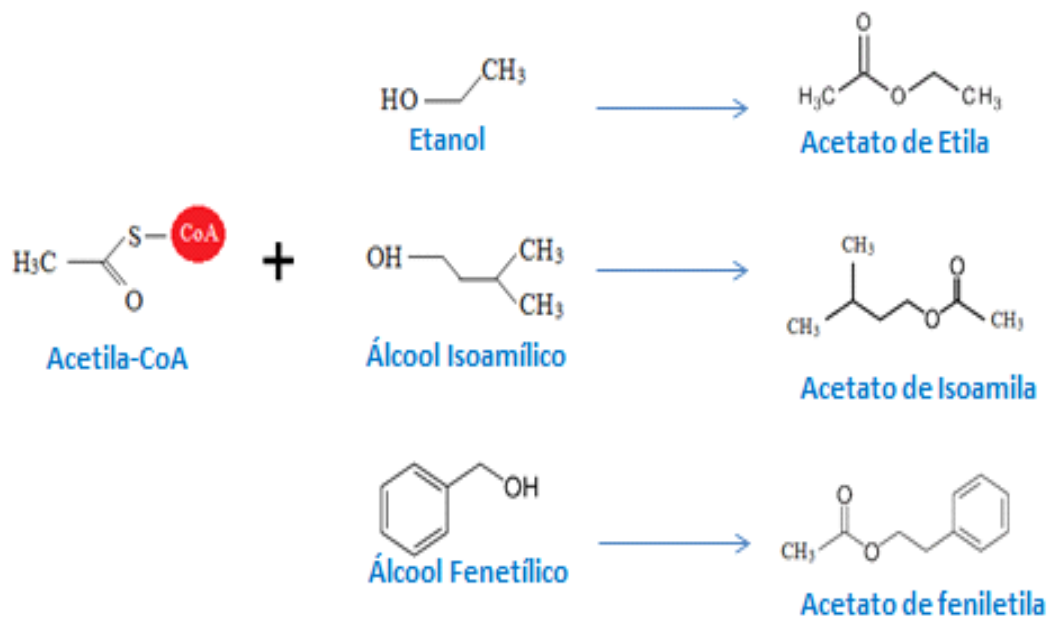


Figura 6. Rota metabólica para formação de ésteres de acetato (PIRES et al., 2014).

## 2.4. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE METABÓLITOS

Para analisar os componentes voláteis obtidos na fermentação, separando-os na mistura complexa em que se encontram, técnicas analíticas de cromatografia são bastante empregadas. A cromatografia pode ser líquida ou gasosa. No segundo caso, pode estar acoplada a um detector por ionização de chama (GC-FID) ou a um espectrômetro de massas (GCMS). Esses métodos permitem não só a separação e identificação dos metabólitos, que contribuem para composição do perfil sensorial da cerveja, mas também a quantificação desses compostos.

### 2.4.1. Cromatografia Gasosa

Atualmente, a cromatografia gasosa tem sido o método mais utilizado na literatura para análise dos metabólitos presentes na cerveja. Essa técnica analítica, criada por Martin e James em 1952, tem por princípio a partição dos componentes de uma mistura

entre uma fase estacionária líquida ou sólida, que preenche a coluna cromatográfica, e uma fase gasosa ou líquida móvel (NADOLNY *et al.*, 2014). Na Figura 7 é apresentado um esquema da aparelhagem típica usada por esse método analítico.

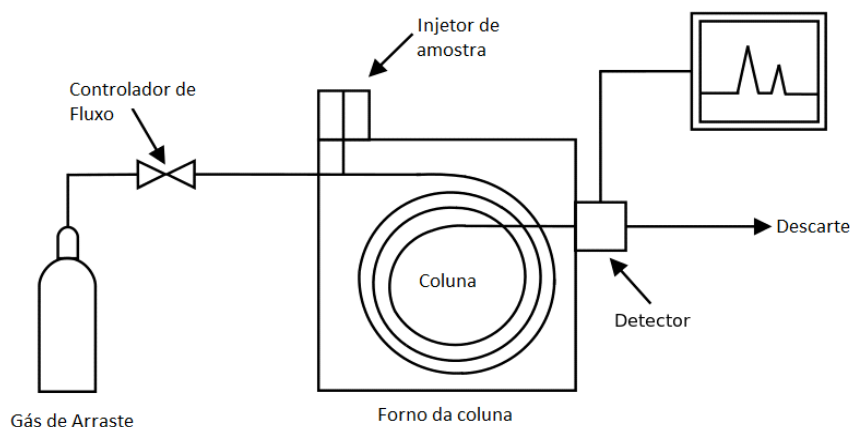


Figura 7. Esquema de um cromatógrafo gasoso (Adaptado de: QUÍMICA INSTRUMENTAL, 2017).

A análise se inicia com a injeção de uma pequena quantidade da amostra no injetor. Em seguida, a amostra é vaporizada (no caso da fase móvel ser gasosa) pelo aquecimento do injetor e da coluna levando ao aumento da temperatura do sistema. Um gás de arraste, a fase móvel, é responsável por carrear a amostra ao longo da coluna até o detector. À medida que a amostra passa pela coluna (fase estacionária), os componentes constituintes da mistura interagem com a coluna e fluem com diferentes velocidades. Isso ocorre devido à interação seletiva entre as fases. O grau da interação depende do ponto de ebulição da molécula e da afinidade com a fase estacionária.

A afinidade entre as fases baseia-se na adsorção ou solubilidade dos componentes na fase estacionária. Quanto menor o ponto de ebulição e maior a interação do componente com a coluna, menor a movimentação do composto ao longo da coluna. Quanto maior o seu ponto de ebulição e a menor afinidade com a fase estacionária, maior a velocidade e detecção. Assim, moléculas diferentes interagem em diferentes intensidades e deixam a coluna em tempos diferentes (CHROMATOGRAPHY ONLINE, 2017).

No momento em que as moléculas, cada uma a seu tempo, deixam a coluna, elas passam por um detector, que pode ser um FID ou um espectrômetro de massas. O detector por ionização de chama, utilizado para as análises quantitativas do presente trabalho, foi proposto em 1958 por Harley, McWilliam e Dewar (BARTLE e MEYERS, 2002). Esse detector apresenta grande aplicabilidade devido à alta sensibilidade, elevada estabilidade e rápida resposta linear. Seu funcionamento se baseia na geração de íons por conta da combustão dos compostos orgânicos do analito pela chama, que é resultante da queima de uma mistura de hidrogênio e ar sintético.

Uma vez formados, os íons são coletados por um eletrodo cilíndrico, posicionado logo acima da chama, que mede a corrente iônica do composto, através da diferença de potencial entre o coletor e o setor onde os íons são formados. A corrente é então amplificada e levada a um sistema de registro, como ilustrado na Figura 8. O desempenho do detector é influenciado principalmente pela relação dos gases envolvidos no processo (Hidrogênio e ar). A vazão ideal para cada gás deve ser estabelecida experimentalmente para o sistema utilizado.

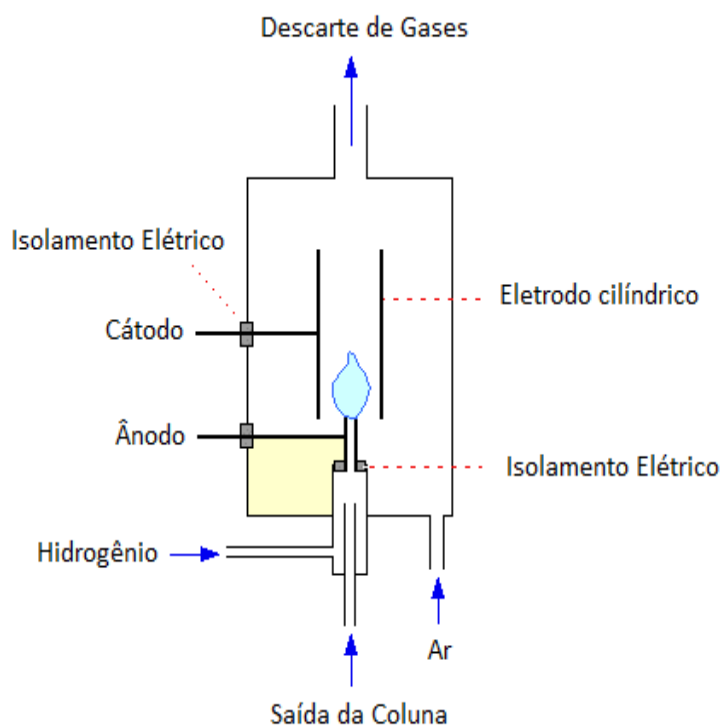


Figura 8. Esquema de um detector por ionização de chama (FID) (Adaptado de: CHROMATOGRAPHY ONLINE, 2017).

Outro detector bastante utilizado é o espectrômetro de massa (MS). O acoplamento desse equipamento ao CG é simples e bastante vantajoso, pois, além de emitir informações sobre a massa molecular e estrutura, aumenta a seletividade geral do processo. A espectrometria de massas tem como princípio a coleta de informações sobre o composto em função da razão massa/carga ( $m/z$ ), resultante da fragmentação da molécula em partículas carregadas (CHIARADIA *et al.*, 2008).

O MS é composto por uma câmara de formação de íons, uma câmara de vácuo, um sistema para detecção e um sistema para registro dos dados obtidos, como mostrado na Figura 9. Esse sistema permite análises qualitativas e quantitativas e leva à obtenção de um espectro limpo, devido à fragmentação ser branda, diferentemente do que ocorre com o FID, que pode por algumas vezes deixar de identificar uma molécula, como consequência de uma fragmentação rápida e intensa (CHIARADIA *et al.*, 2008).

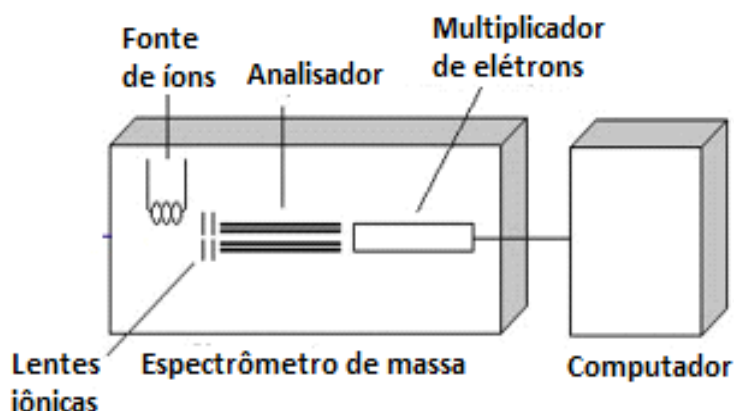


Figura 9. Esquema do Espectrômetro de massa que é acoplado ao GC (Adaptado de: WOO e THET, 2015).

No presente trabalho a cromatografia gasosa com FID foi utilizada para conduzir as análises quantitativas, pois, além de ser um sistema bastante citado na literatura para a extração de metabólitos voláteis na cerveja, resulta em um método eficiente, como estabelecido em trabalho anterior (CHARANEK, 2015). O CGMS foi utilizado apenas para analisar qualitativamente os compostos presentes na cerveja produzida para o estudo.

#### **2.4.2. Extração líquido-líquido com Salting Out**

As técnicas de cromatografia são adequadas para analisar amostras com misturas de componentes. Entretanto, para determinar alguns analitos mais complexos ou em fase aquosa, faz-se necessária uma etapa de extração antes de adicionar a amostra à coluna. Sem essa etapa prévia, alguns compostos podem adsorver na coluna ou degradá-la, alterando os tempos de retenção esperado dos compostos analisados (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Assim, a boa preparação das amostras inclui uma etapa de extração, para melhorar as condições de análises e evitar danos aos equipamentos.

A técnica de extração líquido-líquido (LLE), também conhecida como extração por solvente, é uma das técnicas mais antigas e amplamente utilizadas para preparação de amostras para análises qualitativas e quantitativas (CANTWELL e LOSIER, 2002). Este método consiste em transferir o soluto de um solvente para outro, tipicamente água e um solvente orgânico. A finalidade é isolar os compostos voláteis da fase aquosa em que se encontram. Os solventes devem ser imiscíveis e a passagem do soluto se dá em função de polaridade e solubilidade relativa nos diferentes meios. Componentes apolares, por exemplo, são mais bem extraídos para a fase orgânica.

Uma desvantagem do método é usar solventes imiscíveis em água (apolares), devido às suas baixas constantes dielétricas, que resulta na extração pequena dos solutos mais carregados ou muito polares. Assim, como alternativa, um sal inorgânico em altas concentrações pode ser adicionado à fase aquosa até a saturação. Com a fase saturada, a solubilidade dos compostos do soluto diminui e estes migram mais eficientemente para a fase orgânica com mais facilidade. Esse método é conhecido como extração líquido-líquido com *Salting Out* (SALLE) (MAJORS, 2009).

### **2.5. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Planejar experimentos baseados em métodos estatísticos constitui uma alternativa eficiente para obter informações úteis sobre determinado sistema, permitindo realizar um número mínimo de experimentos, diminuindo o custo e o tempo das



análises (BARROS NETO *et al.*, 2010). O planejamento experimental inclui a especificação do conjunto de procedimentos realizados, a definição dos equipamentos utilizados e a escolha das variáveis e condições de estudo, para que a resposta de interesse seja obtida (SHWAAB e PINTO, 2011).

### **2.5.1. Planejamento Fatorial**

Uma técnica muito utilizada para o planejamento de experimentos é o planejamento fatorial. Trata-se de uma técnica simples e comumente aplicada para triagens (screening) ou quando mais de uma variável (variáveis independentes) precisa ser analisada. Usualmente, em um experimento sem um planejamento estatístico, as variáveis são analisadas uma por vez e sem considerar os efeitos de interação entre elas, o que pode afetar a resposta em estudo. Quando se aplica o plano fatorial, os efeitos das variáveis individuais e suas interações (efeitos de sinergia) podem ser avaliados simultaneamente, permitindo uma avaliação mais completa do espaço amostral (BRASIL, 2007; SCHWAAB e PINTO, 2011).

Para realizar esse tipo de planejamento, faz-se necessário variar os valores das variáveis de estudo (níveis), a fim de observar o efeito da mudança na variável resposta. O caso mais simples de planejamento fatorial é aquele em que cada fator é variado em apenas dois níveis. Assim, para caracterizar um planejamento fatorial  $2^k$ , um número equivalente a  $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$  de ensaios diferentes deve ser executado (BARROS NETO *et al.*, 2010). Esta representação mostra que, para um plano fatorial a 2 níveis e 2 fatores, por exemplo, 4 experimentos precisam ser realizados.

Os níveis são codificados pelos sinais de (-), para o nível inferior, e pelo sinal de (+), para o nível superior, adimensionalizando as variáveis nessa região [-1,+1]. Estes sinais permitem esquematizar a matriz de planejamento, com a combinação dos níveis e também determinar a influência das variáveis e das respectivas sinergias sobre o sistema (BRASIL *et al.*, 2007).

Os ensaios de um planejamento experimental devem ser realizados com um número significativo de réplicas, para que o erro experimental possa ser estimado ao longo da região de experimentação. As réplicas devem ser realizadas repetindo-se

fielmente os procedimentos adotados, permitindo caracterizar a reprodutibilidade do experimento.

As réplicas são muito úteis para análise de dados, permitindo um tratamento apropriado dos dados experimentais e a melhor estimação e validação dos parâmetros (SCHWAAB e PINTO, 2011).

Outra estratégia utilizada para a obtenção de uma resposta significativa é utilizar um ponto central no plano fatorial. Além de explorar melhor a região experimental, o ponto central permite manter a ortogonalidade do plano e avaliar ao mesmo tempo se a curvatura na superfície de resposta é significativa. Assim, torna-se possível avaliar se o ajuste com um modelo linear é suficiente ou se é necessária a presença de ao menos um efeito não-linear (CHRISTENSEN, 1996) (SCHWAAB e PINTO, 2011).

As réplicas no ponto central também são de grande utilidade para a análise do sistema. Elas podem ser utilizadas para estimar a variância experimental, caso seja possível admitir que os erros experimentais são constantes na região de experimentação. Quando utilizada no cálculo das incertezas dos efeitos, torna-se possível observar quais efeitos são significativos. O número de réplicas em cada nível, bem como no ponto central, deve ser considerado cuidadosamente, para que não seja necessário um número exageradamente grande de experimentos (BREITKREITZ, 2014).

## **2.5.2. Testes Estatísticos**

### **2.5.2.1. Distribuição t de Student**

Criada por William Gosset, a distribuição t de Student é bastante empregada em análises estatísticas, com aplicações tanto voltadas para teste de hipóteses, quanto para modelagem. A importância da distribuição t de Student deve-se principalmente por permitir que a região de confiança em que a média verdadeira se encontra seja delimitada de maneira precisa, partindo de valores amostrados e admitindo-se a distribuição normal dos dados (Teste t de Student) (SCHWAAB e PINTO, 2007).

A distribuição t é comumente descrita com auxílio de tabelas, que mostram valores para as probabilidades acumuladas como função do intervalo de confiança e do tamanho do conjunto amostral (número de réplicas). Para realizar o teste, faz-se necessário conhecer a média e a variância amostral, bem como o número de réplicas da variável aleatória. Assim, a variável normalizada t é representada pela equação (SCHWAAB e PINTO, 2007):

$$t = \frac{\bar{X} - \mu_x}{\frac{s_x}{\sqrt{N}}} \quad (1)$$

Sendo  $\bar{X}$  a média amostral,  $s_x$  o desvio padrão amostral,  $\mu_x$  a média verdadeira e N o número de réplicas. O valor de t pode ser encontrado como função do grau de confiança ( $\alpha_1$ ) e do número de réplicas, das equações (SCHWAAB e PINTO, 2007):

$$P_{AC} = \frac{(1-\alpha)}{2} \quad , \quad P_{AC} = \frac{(1+\alpha)}{2} \quad (2)$$

Em que  $P_{AC}$  é a probabilidade acumulada da distribuição t de Student.

A distribuição t é simétrica em relação ao eixo y. Assim, os valores de  $t_1$  e  $t_2$  devem ser obtidos para construir o intervalo de confiança da média real, mostrado abaixo (SCHWAAB e PINTO, 2007).

$$t_1 < t < t_2 \quad (3)$$

Assim, para definir o intervalo em que a média pode ser encontrada, com certo grau de confiança, substitui-se a Equação (1) na Equação (3). Após manipulações algébricas, isolando a média, obtém-se a equação (SCHWAAB e PINTO, 2007):

$$\left(\bar{X} + \frac{s_x t_1}{\sqrt{N}}\right) < \mu_x < \left(\bar{X} + \frac{s_x t_2}{\sqrt{N}}\right) \quad (4)$$

### 2.5.2.2. Distribuição de Fisher

A distribuição F de Fisher é uma distribuição de probabilidade contínua, por meio da qual é possível comparar de maneira eficiente as diferentes variâncias amostrais obtidas experimentalmente, de forma análoga ao teste t de student. Para realizar esse teste, consideremos duas variáveis aleatórias, com flutuações distribuídas normalmente, x e y, com variâncias  $\sigma_x^2$  e  $\sigma_y^2$ , variâncias amostrais  $S_x^2$  e  $S_y^2$ . Define-se assim a variável normalizada F por meio da Equação (5) (SCHWAAB & PINTO, 2007).

$$F = \frac{s_x^2/\sigma_x^2}{s_y^2/\sigma_y^2} \quad (5)$$

A distribuição F também é descrita comumente com auxílio de tabelas padronizadas para valores de probabilidades acumuladas como função do número de réplicas, sendo que a variável F é definida no domínio real positivo. Dessa forma, para encontrar os valores de F, com certo grau de confiança, e testar se as variâncias apresentam valores similares, dado o número de réplicas, é necessário fazer (SCHWAAB e PINTO, 2007):

$$F = \frac{s_x^2}{s_y^2} \quad (6)$$

Que admite que as variâncias reais são iguais. Caso as variâncias desconhecidas possam ser consideradas semelhantes, a Equação (6) ganha a forma (SCHWAAB e PINTO, 2007):

$$F_1 < \frac{s_x^2}{s_y^2} < F_2 \quad (7)$$

Que são os limites calculados com o auxílio da Equação (2) uma vez definido o grau de confiança.

### **2.5.3. Modelagem Empírica**

Um modelo estatístico é aquele que descreve o comportamento de um sistema baseado apenas em evidências experimentais. Por meio desse tipo de modelo é possível representar o processo em estudo na região experimental investigada, embora a extrapolação seja pouco recomendada, sendo por isso sendo considerado como um modelo local (BARROS NETO *et al.*, 2010).

Com auxílio do modelo, as variáveis independentes são vinculadas e os eventos ocorridos podem então ser explicados, possibilitando a previsão de possível comportamento do processo quando se varia a condição experimental. Como todo dado experimental apresenta incertezas e como nem todas as variáveis do sistema podem ser medidas e/ou controladas com precisão, um modelo não é capaz de representar completamente a realidade (SCHWAAB e PINTO, 2007).

Para construir o modelo empírico, é necessário obter um conjunto de observações da variável estudada e uma distribuição de probabilidade associada ao processo de medição. Geralmente, o modelo expressa como uma variável resposta,  $y$ , depende de um conjunto de variáveis independentes  $T$  que influenciam no sistema (BARROS NETO *et al.*, 2010).

$$y = f(T) \quad (8)$$

Toda observação experimental é afetada por desvios aleatórios. Assim, um modelo linear pode ser mais bem representado por:

$$y = \beta_0 + \beta_1 T + \varepsilon \quad (9)$$

Em que  $\beta_0$  e  $\beta_1$  são os parâmetros do modelo, T é a variável independente que afeta o processo e  $\varepsilon$  é o erro aleatório associado à determinação experimental da variável T (BARROS NETO *et al.*, 2010).

#### **2.5.4. Modelagem e Microcinética**

As técnicas de modelagem têm sido muito utilizadas para descrever de forma adequada como ocorre a interação entre as variáveis independentes e como elas afetam as resposta do problema. Essa informação é de fundamental importância para o controle e a otimização do processo. Em particular, quando se trata de mecanismos cinéticos, as equações fundamentais de taxas de reação podem ser propostas para a estimação de parâmetros e a determinação das constantes de equilíbrio, para que os fenômenos possam ser compreendidos (FROMENT *et al.*, 1979).

A fermentação do mosto para fabricação de cervejas também tem sido estudada com auxílio de modelos matemáticos, ferramentas poderosas para o estudo do mecanismo cinético do processo, bem como para a operação (PARCUNEV *et al.*, 2012).

Para a construção do modelo e estimação dos parâmetros dados experimentais devem ser obtidos. Dessa forma, o estudo dos erros envolvidos nos experimentos torna-se importante para analisar o processo químico de maneira adequada. Porém, em geral, pesquisadores acabam admitindo hipóteses e fazendo simplificações para tratar os dados, sem evidências experimentais rigorosas, de forma que a caracterização do erro acaba sendo negligenciada (FERRARIS, 2000).

Um exemplo disso é a consideração usual de que os erros experimentais seguem uma distribuição normal, de que as variáveis independentes estão livres de erro e de que erros de medição são constantes ao longo da região de experimentação. Essas considerações podem levar a uma análise estatística duvidosa, ou mesmo errônea, dos resultados obtidos, de forma que essas análises dependem fortemente da natureza do erro experimental (LARENTIS *et al.*, 2003).

Essas hipóteses simplificadoras permitem também obter uma função objetivo simplificada, definida na Equação (10), que tem por função medir a distância entre os

valores preditos pelo modelo e os valores observados experimentalmente, definindo portanto uma métrica.

$$F = (y^* - y^e)^T V^{-1} (y^* - y^e) \quad (10)$$

Na Equação (10),  $y^*$  o vetor das predições do modelo,  $y^e$  é o vetor dos valores experimentais e  $V$  é a matrix de covariâncias dos erros experimentais, que também afeta a significância do modelo e de seus parâmetros, descrita de forma simplificada em termos da matriz de covariância dos parâmetros do modelo ( $V_\alpha$ ).

$$V_\alpha = (BVB^T)^{-1} \quad (11)$$

No entanto, essas simplificações podem gerar conclusões inconsistentes sobre a cinética do processo, o que não deveria acontecer, já que a caracterização adequada da matriz de covariâncias é fundamental para caracterizar a precisão dos parâmetros cinéticos (LARENTIS *et al.*, 2003). A matriz de covariâncias permite calcular as incertezas paramétricas com o auxílio da Equação (11), em que  $B$  é a matriz de sensibilidades, que contem as primeiras derivadas das respostas do modelo em relação a seus respectivos parâmetros.

A matriz de correlações das medidas disponíveis na forma de réplicas permite também a observação detalhada dos fenômenos cinéticos locais, o que define uma análise microcinética. Considerando que as flutuações experimentais podem não ser independentes nem constantes, pode-se dizer que as flutuações experimentais das variáveis analisadas afetam umas as outras, revelando o mecanismo local subjacente (o que só pode ser realizado com a caracterização detalhada do erro experimental e a condução de replicatas) (LARENTIS *et al.*, 2003).

Como os erros experimentais são usualmente de baixa magnitude, quando as réplicas dos experimentos são realizadas pode-se utilizar a expressão microcinética (ou cinética local) para caracterizar o estudo. Entende-se, assim, que as flutuações das repetições estão ligadas ao mecanismo de reação particular que ocorre, como por

exemplo, na fermentação alcoólica realizada pela levedura. Assim, as informações sobre os erros dão informações sobre o mecanismo cinético local, que pode ser então usado para propor uma modelagem e uma interpretação dos fenômenos cinéticos (LARENTIS *et al.*, 2003).

## **2.6. COMENTÁRIOS FINAIS**

Com base no que foi apresentado nessa breve revisão, pode-se observar que a etapa mais importante do processo de produção de cerveja tem sido muito estudada. Os fatores que mais afetam o processo fermentativo são bem conhecidos. Os metabólitos voláteis gerados são, em sua maioria, catalogados. Porém, falta ainda um estudo que correlacione de que forma essas variáveis citadas, como temperatura e teor de carbonos, controladas durante a fermentação do mosto, afetam a formação dos produtos principais e metabólitos secundários. Não há muita informação também sobre como as relações dessas variáveis afetam a qualidade do produto final.

O uso de leveduras extraídas do ambiente, frutos e plantas também vem sendo abordado. Entretanto, como a variedade da microbiota brasileira é muito grande, faz-se necessário ampliar esses estudos e conhecer cada vez mais a capacidade de fermentação de leveduras isoladas ou extraídas na produção da cerveja e de outros alimentos. Esses estudos podem ampliar de forma significativa as oportunidades para o mercado biotecnológico do país.



## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados, bem como os métodos de operação e caracterização aplicados no trabalho estão descritos neste capítulo e organizados de acordo com cada etapa realizada: (i) planejamento experimental, (ii) procedimentos experimentais e (iii) análises analíticas.

### 3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Com o intuito de avaliar de que modo as variáveis do processo afetam a formação de metabólitos, foi realizado um planejamento fatorial. As variáveis independentes escolhidas foram, inicialmente, a temperatura e o grau brix inicial, medida de concentração do açúcar no meio de fermentação. O pH e o volume de inóculo foram mantidos constantes em todos os experimentos.

O plano fatorial a dois níveis com ponto central foi o escolhido para inferir sobre o efeito das variáveis. Esse tipo de plano permite caracterizar os efeitos principais de cada variável estudada, as sinergias existentes e a possível ocorrência de respostas não lineares. Para cada condição experimental, 10 réplicas foram realizadas. O elevado número de réplicas torna possível correlacionar os dados medidos de forma a obter informações sobre a cinética local do processo fermentativo. As réplicas também são muito úteis para estabelecer intervalos de confiança mais precisos (DA ROS *et al.*, 2017).

Os níveis foram selecionados com base nos valores típicos observados na literatura. Esses valores foram escolhidos como pontos centrais, fazendo mudanças para baixo e para cima para definir os níveis superior e inferior, como disposto na Tabela 2.

Para obter todas as condições que compõem a matriz de experimentos, a matriz de planejamento foi elaborada como descrito na Tabela 3.

Tabela 2. Variáveis independentes do processo e respectivos níveis experimentais.

<b>Variáveis Independentes</b>	<b>Nível Inferior (-1)</b>	<b>Ponto Central (0)</b>	<b>Nível Superior (+1)</b>
<b>T (°C)</b>	15	19	23
<b>°Br inicial</b>	10	12,5	15

Tabela 3. Matriz de planejamento experimental.

<b>Ensaio</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>°Brix Inicial</b>
<b>F01</b>	23	15
<b>F02</b>	23	10
<b>F03</b>	19	12,5
<b>F04</b>	15	15
<b>F05</b>	15	10

## **3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

### **3.2.1. Microrganismo**

No presente trabalho, utilizou-se uma cepa de leveduras extraídas da jabuticaba. A levedura foi cedida pela empresa Vinho do Poeta, localizada em Santa Bárbara-MG, em garrafas contendo suco da jabuticaba adoçado (fruto espremido, com açúcar) em março de 2016. Uma amostra do suco foi colocada em meio YPD (yeast extract, peptone e dextrose) modificado líquido, composto por 20% de extrato de levedura, 20% de sacarose e 10% de peptona. Após 48 horas, em incubador rotativo (modelo I26 da New Brunswick Scientific, Estados Unidos) a 200 rpm e 33 °C, o meio se encontrava turvo, indicando o crescimento microbiano. Uma amostra do meio com a levedura foi colocada em uma lâmina e analisada no microscópio (modelo AXIO Lab.A1, da ZEISS,

Alemanha). Foi assim possível observar que havia uma única levedura presente e que não havia necessidade de isolá-la de outras espécies.

A levedura foi ainda testada em laboratório para ser identificada com Ale ou Lager, identificação importante no âmbito cervejeiro. O teste realizado consistiu apenas em cultivar a levedura em duas condições diferentes de temperatura. 24 °C e 33 °C. Leveduras tipo Lager não crescem bem a altas temperaturas, o oposto do que ocorre com as leveduras Ale. Os pré-inóculos foram então incubados nas condições citadas, por 24 horas e 200 rpm. O melhor crescimento foi observado com auxílio de medida da densidade ótica, no espectrofotômetro (Agilent modelo 4583, Estados Unidos), a 600 nm. O preparo detalhado do inóculo está descrito na seção seguinte.

### **3.2.2. Preparo e padronização do inóculo**

O estoque da levedura extraída da casca da jabuticaba foi armazenado a -80 °C em microtubos contendo glicerol, em um ultrafreezer vertical da Glacier com temperatura mínima de -86 °C. Para ativar o microrganismo, todo conteúdo do criotubo foi transferido de maneira asséptica para um erlenmeyer de 500 mL, contendo 200 mL de meio YPD modificado líquido previamente esterilizado, em capela de fluxo laminar (Trox Technik, modelo TLF CLII A1, Brasil). O pré-inóculo foi incubado em um incubador rotativo (modelo I26 da New Brunswick Scientific, Estados Unidos), a 33 °C e 200 rpm, por 24 horas.

Antes de ser adicionado aos erlenmeyers com mosto cervejeiro para o ensaio de fermentação, o inóculo foi padronizado. Esse processo consistiu em uma contagem celular, garantindo que a quantidade desejada de células seria a mesma introduzida em todas as réplicas de todas as fermentações. O valor adotado foi de  $1 \times 10^6$  células/mL/°Br, sendo essa a quantidade mais comum utilizada em cervejarias.

As células foram contadas em uma câmara de Neubauer, conforme o método descrito por HEMOCITOMETER (2015). Inicialmente, o inóculo foi diluído, até que fosse possível contar entre 30 a 300 células, em um volume de  $4 \times 10^{-6}$  mL com auxílio de um microscópio com ampliação de 400x e lentes com filtro PH2 (modelo AXIO Lab.A1, da ZEISS, Alemanha). A contagem foi realizada em triplicata.

Em seguida, diluições do inóculo foram realizadas, a fim de obter diferentes concentrações e medir a absorvância de cada uma delas em um espectrofotômetro (Agilent modelo 4583, Estados Unidos). A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 600 nm, utilizando a água destilada como branco. Com a aquisição desses dados, uma curva de calibração relacionando a absorvância com a concentração celular foi elaborada.

Uma segunda curva, relacionando agora o peso seco e a absorvância também foi elaborada. Para essa curva, foram adicionados em quatro tubos falcons de 50 mL de volume útil, 25 mL do inóculo preparado. O volume desejado foi medido com uma pipeta volumétrica. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com água e centrifugadas novamente. O procedimento foi realizado duas vezes. Após a lavagem, as células foram resuspensas em pouca água, para que pudessem ser transferidas para quatro cadinhos de porcelana de massas conhecidas. Os cadinhos com as células foram colocados na estufa para secar durante 72 horas a 150°C. Em seguida, os cadinhos com as células secas foram pesados e a massa seca das células foi calculada. Obteve-se assim a concentração de 0,007936 g/mL. Diluindo a amostra algumas vezes e medindo a absorvância em cada diluição, foi possível obter uma curva de calibração.

### **3.2.3. Meio de fermentação**

O meio utilizado para a fermentação foi o mosto cervejeiro, baseado nos mostos comumente utilizados em cervejarias artesanais. Para produzir o mosto, foi utilizado: extrato de malte seco (LAMAS), que fornece 10 °Br para cada 100g/L; e lúpulo Hallertauer tradition T90 em pellets (LAMAS), contendo 4,6% de alfa ácidos e água mineral. Inicialmente, 20 L de água e 2 kg de extrato de malte são colocados em um vaso de inox 304 (volume útil de 50 L) com uma resistência acoplada (220 V e 4000 W de potência) e misturados com um bastão de vidro. A mistura era aquecida pela resistência até atingir o ponto de fervura, quando eram adicionados 20 g do lúpulo, responsável pelo amargor da cerveja. O meio era fervido durante 90 minutos. Ao fim da fervura, eram adicionados 10 g de lúpulo, agora responsável pelo aroma. O meio é então resfriado em seguida.

O grau brix inicial para cada ensaio era ajustado de duas formas: ou diluindo o mosto com água mineral, para diminuir o °Br; ou adicionando açúcar (refinado convencional) para aumentar o °Br, levando em conta que 1 °Br é equivalente a 1 g de açúcar para cada 100 g do mosto. O amargor da cerveja é calculado através da quantidade de lúpulo adicionada no mosto, o °Br inicial, o volume de solução e o tempo de fervura. Os valores obtidos compõem uma escala chamada IBU (International Bitterness Unit), que mede o grau de amargor da cerveja, variando de 0 a 120. O IBU da cerveja produzida neste trabalho variou entre 14,8 (15 °Br) a 17 (10 °Br).

A panela utilizada para o preparo do meio pode ser vista na Figura 10.



Figura 10. Fervura do mosto cervejeiro em panela de aço inox.

### **3.2.4. Fermentações**

Os experimentos das fermentações foram realizados em incubador rotativo, (modelo I26 da New Brunswick Scientific, Estados Unidos), apenas com controle da temperatura para cada condição de fermentação estabelecida no planejamento. Um termômetro foi colocado na parede interna do incubador, para aferir se a temperatura seria mantida constante, durante todo ensaio, como programado no equipamento.

Para cada ensaio, foram utilizados 10 Erlenmeyers de 500 mL, contendo 300 mL do meio e a quantidade do inóculo calculada, a fim de obter uma concentração de 1 milhão de células por mL por °Br . O pH inicial da fermentação foi mantido em 5,2. Para garantir que o mosto preparado estava na condição escolhida, um medidor Metler-Toledo modelo S20K foi utilizado. Caso fosse necessário fazer o ajuste de pH, duas soluções foram preparadas: para diminuir o pH, caso maior que 5,2, uma solução de HCl 10% foi preparada a partir de uma solução de HCl 35% (Vetec, Rio de Janeiro); para aumento do pH, caso o pH se encontrasse abaixo de 5,2, uma solução de NaOH 2M foi preparada a partir do NaOH sólido 97% (Vetec, Rio de Janeiro).

O tempo de fermentação variou de 4 a 6 dias, dependendo das condições do processo. A cada 24 horas uma amostra de 3 mL era retirada para as análises dos metabólitos, viabilidade celular e do °Br . Quando após dois dias seguidos o °Br apresenta valor estável, concluía-se que a fermentação havia chegado ao fim. As Figuras 11 e 12 ilustram a etapa de fermentação no incubador.

Após o término da etapa de fermentação, os erlenmeyers do ensaio foram levados a uma geladeira acoplada a um controlador de temperatura para a etapa de maturação (Figura 13). A maturação foi conduzida durante 7 dias, contados após o último dia de fermentação, na temperatura de 0 °C. Esta etapa tem como objetivo promover a estabilização dos metabólitos formados na cerveja, bem como a sedimentação das leveduras e detritos do malte e lúpulo eventualmente suspensos durante a fermentação. Ao final desta etapa, uma amostra de 3 mL foi recolhida para análise e comparação com o último ponto da fermentação.



Figura 11. Ensaio de fermentação visto pelo interior do incubador.

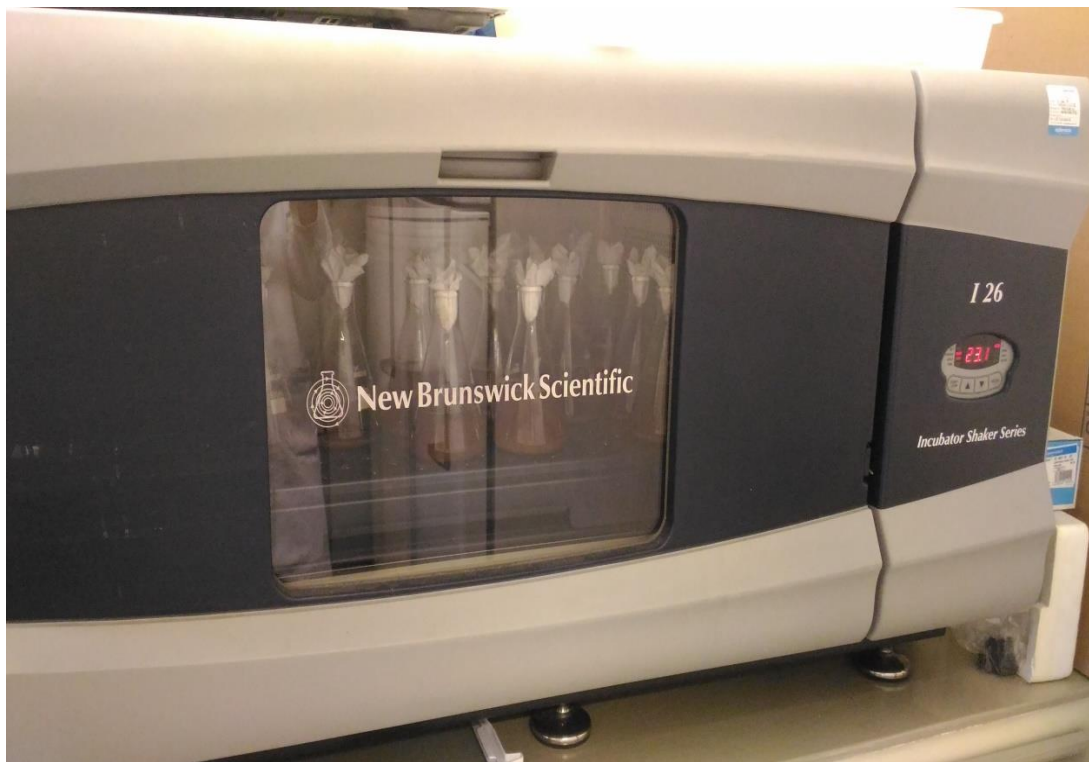


Figura 12. Incubador rotativo com controle de temperatura durante o ensaio de fermentação a 23 °C.



Figura 13. Fotografia da etapa de maturação pós-fermentação conduzida na geladeira acoplada a um controlador de temperatura.

### **3.2.5. Medição do grau brix (°Br)**

A medição do °Br é muito importante para análise da concentração de açúcares no meio, da densidade do mosto cervejeiro, do progresso e do fim da fermentação. Para medir o °Br, foi utilizado um refratômetro portátil (Metler-Toledo modelo RSG-100ATC, Suíça), com uma escala de 0,2 °Br. A medição do °Br da amostra era realizada colocando-se uma amostra sobre a lente azulada do aparelho e cobrindo o porta amostras com a parte plástica móvel, sem fazer força para evitar o aparecimento de bolhas. Um filme da amostra era então formado sobre a lente. Ao colocar o aparelho contra a luz, era possível fazer a leitura na escala do outro lado do aparelho. Na escala, podia-se observar uma linha que dividia duas regiões, uma branca e outra azul, que



indicava o °Br da amostra. Na Figura 14 é possível observar a escala do refratômetro e o equipamento de medição.



Figura 14. Refratômetro portátil e escala de medição para leitura do grau brix utilizado nos experimentos.

### **3.2.6. Viabilidade Celular**

A viabilidade celular é outro fator a que se deve atentar durante a fermentação da cerveja. Para quantificar as células vivas, diariamente foi utilizado um método colorimétrico com azul de metileno (Vetec, Rio de Janeiro). Primeiramente, as células da amostra eram diluídas em água até atingirem uma quantidade de aproximadamente 100 células no hemocitômetro. Em seguida, era preparada uma solução aquosa de 0,1% (m/v) de azul de metileno. Era misturado 1 mL da amostra diluída com 1 mL da solução de azul de metileno. A mistura era homogeneizada manualmente, com movimentos rotacionais, por cerca de 2 min. A amostra era então analisada em um microscópio (nas mesmas condições da contagem) com auxílio de uma câmara de Neubauer, para possibilitar a contagem.

As células mortas, com suas membranas já inativas, são permeadas pelo corante azul e mudam de coloração para um azul intenso. Dessa forma, as células mortas foram contadas e a porcentagem de células vivas (não coradas) obtidas caracterizou a

viabilidade celular. Na Figura 15 é possível observar as células 100% viáveis, de coloração amarelada. A Figura 16 mostra as células utilizadas após 1 mês de fermentação, ficando claro que algumas células já estavam mortas, apresentando a coloração azul característica.

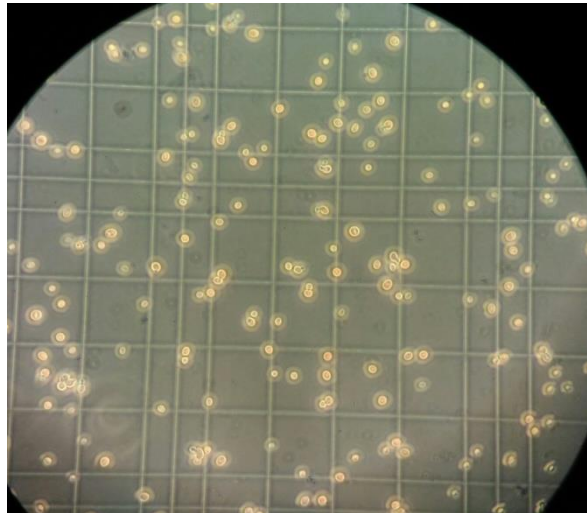


Figura 15. Fotografia de células com 100% de viabilidade, no início da fermentação, visualizadas em um microscópio eletrônico com o aumento de 400 vezes (Ensaio do Ponto Central).

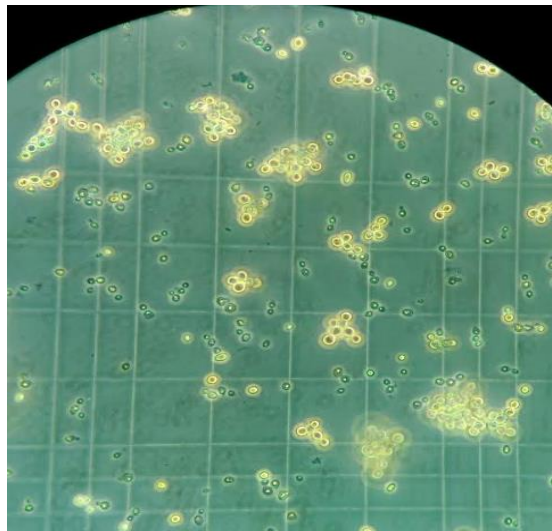


Figura 16. Fotografia de células mortas identificadas com o método colorimétrico com azul de metileno, visualizadas em um microscópio eletrônico com o aumento de 400 vezes, após um mês de ensaio.

### **3.3. ANÁLISES**

As técnicas de cromatografia gasosa, GC-FID e GCMS, foram utilizadas como métodos analíticos para analisar os componentes voláteis formados durante a fermentação.

#### **3.3.1. GCMS**

Como citado anteriormente, foi realizada uma análise qualitativa, para determinar os componentes gerados pela levedura utilizada e escolher os componentes que seriam estudados no trabalho. A análise foi conduzida em um cromatógrafo gasoso (modelo 7890B da Agilent Technologies, Estados Unidos), acoplado a um espectrômetro de massa da mesma marca. O hidrogênio foi utilizado como fase móvel. Foi utilizada uma coluna capilar (modelo HP-5MS, 30m x 0,250 mm x 0,25 $\mu$ m, Agilent Technologies, Estados Unidos).

#### **3.3.2. GC**

Para as análises quantitativas dos experimentos, foi utilizado um cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies, modelo 7890A, Estados Unidos), acoplado a um detector do tipo FID. O gás de arraste utilizado também foi o hidrogênio. O cromatógrafo conta com um amostrador automático e uma seringa de 10  $\mu$ L. A coluna utilizada foi uma coluna capilar (modelo DB-5 apolar, 50m x 320  $\mu$ m x 0,25  $\mu$ m, Agilent Technologies, Estados Unidos).

A área do pico do etanol no cromatograma é muito superior à dos demais componentes, isso ocorre devido ao componente estar presente em quantidades maiores que os demais metabólitos na cerveja. Assim, duas corridas com esses diferentes métodos, uma para o etanol e outra para os demais metabólitos, foram realizadas, sendo que a primeira usou um volume de injeção menor e a segunda usou maior quantidade injetada, para permitir a quantificação dos demais voláteis. As condições utilizadas em cada método estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4. Condições dos métodos cromatográficos utilizados para caracterizar o etanol e os demais metabólitos voláteis.

<b>Parâmetro</b>	<b>Método Etanol</b>	<b>Método Metabólitos Voláteis</b>
<b>Volume de Injeção (µL)</b>	1	5
<i>Split Ratio</i>	50:1	10:01
<b>Temperatura de Entrada (°C)</b>	200	200
<b>Pressão de Entrada (psi)</b>	5.7	6
<b>Temperatura do FID (°C)</b>	300	300
<b>Vazão de H<sub>2</sub> no FID (mL/min)</b>	30	30
<b>Vazão de Ar no FID (mL/min)</b>	400	400
<b>Vazão de Makeup no FID (mL/min)</b>	25	25
<b>Temperatura inicial do Forno (°C)</b>	40 por 10 min	30 por 10 min
<b>Rampa do Forno</b>	20 até 260 °C por 3 min	20 até 260 °C por 3 min

### **3.3.3. Extração Líquido-Líquido com salting-out**

A fim de preparar as amostras para o procedimento cromatográfico, foi realizada uma extração com o solvente 1,2-dicloroetano (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) e foi utilizado o sal fosfato dibásico de potássio (Vetec, Rio de Janeiro) para o *salting-out*. A combinação desse solvente com o sal viabilizou a detecção dos metabólitos voláteis de interesse, possibilitando também fazer curvas de calibração para cada um dos compostos no cromatógrafo gasoso e permitindo a posterior quantificação (CHARANEK, 2016).

O método da extração consistiu em adicionar 3,5 g do sal em um tubo falcon de 15 mL, seguido da adição de 2 mL da amostra e 2 mL do solvente utilizado. A mistura do tubo era então homogeneizada em um vórtex (Genie 2 da Scientific Industries, Estados Unidos), por 2 min. Em seguida, a mistura era levada a uma centrífuga (Thermo

Scientific modelo Sorvall Legend XTR, Estados Unidos), a uma velocidade de rotação de 7000 rpm durante 10 min. Nesta etapa, as fases se separavam em fase orgânica e aquosa. A fase menos densa (orgânica) era recolhida e filtrada com um filtro de teflon (PTFE, Macherey-Nagel) com 0,22 µm de diâmetro de poro, com o auxílio de uma seringa. O filtro era descartado a cada amostra filtrada. O filtrado foi coletado em um frasco de amostra próprio para o GC, deixando a amostra pronta para injeção e caracterização.

### **3.3.4. Curvas de calibração para cada componente volátil**

Com o intuito de viabilizar a quantificação dos componentes voláteis estudados, após a obtenção dos cromatogramas no CG foram elaboradas curvas de calibração para cada substância. Essas curvas dispunham a relação entre a área do pico no cromatograma e a concentração de cada metabólito na cerveja. A realização da curva também permitia identificar o tempo de retenção de cada componente, tornando possível diferenciá-los em meio aos outros picos diversos do cromatograma.

A metodologia utilizada para preparo das soluções foi a mesma explicada na seção anterior, utilizando a SALLE. Porém, ao invés de utilizar as amostras, soluções aquosas com diferentes concentrações de cada metabólito puro foram feitas e utilizadas como padrões para elaboração da curva. Assim, os padrões utilizados foram de acetaldeído (Vetec, 99%), acetato de isopentila (Sigma-Aldrich, 92%), etanol (Vetec, 99,8%), 2-metil-1-butanol (Sigma-Aldrich, 95%), álcool fenético (Sigma-Aldrich, 99%) e triptofol (Sigma-Aldrich, 97%). As curvas de calibração obtidas são encontradas no apêndice A.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

No presente capítulo são apresentados e discutidos os resultados referentes aos testes realizados para caracterização e avaliação da levedura utilizada. Os resultados obtidos com as fermentações em condições diferenciadas, assim como sua análise bioquímica e estatística, também são mostrados.

### **4.1. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL FERMENTATIVO DA LEVEDURA**

Inicialmente, foi realizado um teste qualitativo para avaliar se a levedura escolhida para o trabalho era capaz de fermentar o mosto cervejeiro, por tratar-se de uma levedura desconhecida e extraída da casca de jabuticabas. O teste consistiu em um ensaio de fermentação a 21 °C e que teve a duração de seis dias, conduzido e analisado como as fermentações descritas na seção anterior. No início da fermentação, após 24 horas, pôde-se perceber a formação de uma espuma característica da fermentação do mosto cervejeiro, chamada de krausen, o que dava o indício de que a levedura estava fermentando bem o mosto.

As análises foram primeiramente realizadas no GCMS, com a finalidade de descobrir quais os componentes eram encontrados em quantidades mais significativas, para posterior análise quantitativa e correlação dos dados. O equipamento identificou seis metabólitos considerados como principais, produzidos pela cepa escolhida: etanol, acetaldeído, fenil etil álcool, 2-metil-1-butanol, triptofol e acetato de isopentila. Assim esses produtos foram os selecionados para dar continuidade à pesquisa. A Figura 17 ilustra as fórmulas estruturais dos componentes estudados.

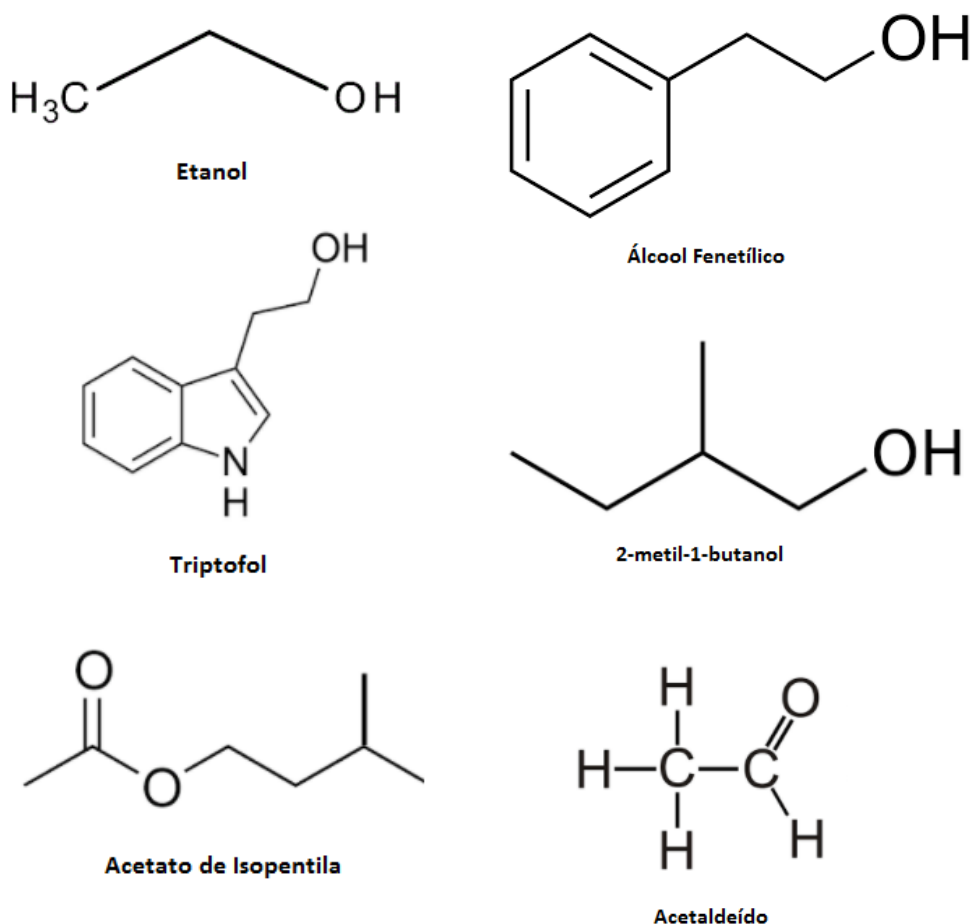


Figura 17. Fórmulas estruturais dos compostos identificados no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa.

## 4.2. CARACTERIZAÇÃO DA LEVEDURA COMO ALE OU LAGER

O teste realizado para diferenciar uma levedura Ale de uma Lager mostrou que a levedura isolada tem um melhor crescimento na temperatura mais elevada, 33 °C, do que na temperatura mais baixa, de 24°C. Em 24 horas, a 33°C, obteve-se 600,13 x 10<sup>6</sup> células de leveduras, enquanto a 24 °C, apenas 195,3 x 10<sup>6</sup> células de leveduras foram obtidas. Isto indica uma grande possibilidade da levedura ser do tipo Ale, que cresce preferencialmente a altas temperaturas.

Os ensaios fermentativos realizados a 19 °C e 23 °C, também mostraram o quão rapidamente a levedura age na etapa de fermentação, que duraram 4 e 5 dias respectivamente. Essa faixa de duração de fermentações também caracteriza uma

levedura do tipo Ale. As leveduras isoladas de ambientes naturais são em sua maioria do tipo Ale, apenas recentemente uma levedura isolada de ambiente natural foi caracterizada como uma levedura Lager (LIBKIND *et al.*, 2011).

### **4.3. VIABILIDADE CELULAR**

A viabilidade celular é um fator considerado muito importante para a fermentação. Em uma fermentação usual com leveduras comerciais da espécie *S. cerevisiae*, a viabilidade celular pode diminuir significativamente ao longo da fermentação, o que não é interessante, pois muitas cervejarias reutilizam as leveduras em bateladas futuras. Assim, garantir a viabilidade do inóculo durante essa etapa no nível mais alto possível é fundamental.

A viabilidade da levedura extraída foi avaliada antes do microrganismo ser inoculado e diariamente durante a fermentação. A porcentagem de células viáveis manteve-se 100% durante as fermentações realizadas, o que mostra que a levedura é resistente às perturbações do meio fermentativo. Entretanto, não foram realizados ensaios consecutivos com o mesmo microrganismo, reaproveitando-o, como é feito em muitas cervejarias, para observar em que momento a viabilidade diminui e as características do produto final podem ser afetadas negativamente. De forma assertiva, a levedura se manteve viável ao longo de todos os ensaios de fermentação.

### **4.4. ENSAIOS FERMENTATIVOS**

Realizando as fermentações propostas no planejamento experimental, pode-se observar, durante os experimentos, que, de maneira geral a levedura fermentou rapidamente o mosto, principalmente quando comparada com a levedura S05 comercial, utilizada no trabalho de CHARANEK (2016). A levedura usada no ensaio de temperatura mais alta, 21 °C, fermentou o mosto em sete dias. A levedura isolada, mesmo nos ensaios de temperatura mínima, 15 °C, fermentou o mosto em seis dias. A rapidez na qual um microrganismo fermenta o mosto é muito importante para os



cervejeiros, pois a produtividade aumenta quando em um menor tempo de trabalho uma maior quantidade de cerveja pode ser produzida.

O °Br ao longo de cada fermentação pode ser observado na Tabela 5. Quando duas medidas de °Br apresentavam o mesmo valor, a fermentação era considerada completa, pois era sinal que não havia diminuição nos açúcares fermentescíveis do meio.

Tabela 5. Valores medidos do °Br ao longo das fermentações.

	° Brix durante as fermentações				
Temperatura	15 °C		19 °C	23 °C	
°Brix Inicial	10,0	15,0	12,5	10,0	15,0
24 h	9,2	13,8	10,0	7,0	10,8
48 h	7,4	10,2	7,8	5,6	8,2
72 h	6,0	9,0	6,8	5,5	7,8
96 h	5,8	8,2	6,6	5,4	7,6
144h	5,6	7,8	6,5	5,4	7,6
168h	5,6	7,8	6,5	5,4	7,6
312h	5,6	7,8	6,5	5,4	7,6

Para aferir sobre a atenuação do mosto pela levedura utilizada, fez-se necessário a correção do °Br final medido. A atenuação é a medida do quão completa foi a fermentação do mosto; ou seja, sobre quanto os açúcares foram consumidos durante a fermentação. Porém, no fim da fermentação o °Br medido representa não só a quantidade de açúcares restantes, como também as quantidades de etanol, glicerol e alguns outros metabólitos, que podem afetar o índice de refração da luz do mosto. Além disso, a quantidade de açúcares na cerveja caracteriza o quão denso o mosto é e normalmente a unidade °Plato (°P) é utilizada no lugar do °Brix para descrever a densidade original e final do mosto, OG e FG, respectivamente.

A correção e conversão dos valores de °Br para valores de OG e FG, para cada ensaio, foi realizada em uma plataforma digital (Brewers Friends). O sítio disponibiliza modelos prontos para correção e conversão dos valores e é atualmente utilizado por

muitos cervejeiros. As correções obtidas como valores de densidade específica, são encontradas na Tabela 6.

Tabela 6. Densidade específica do mosto corrigida.

Temperatura	Densidade do mosto				
	15 °C		19 °C	23 °C	
OG (°P)	10,00	15,00	12,50	10,00	15,00
FG (°P)	3,19	3,70	3,28	3,01	3,53

Na Tabela 6, pode ser observado que, independentemente da densidade inicial do mosto, a densidade final atinge níveis semelhantes, mostrando que a levedura consome os açúcares até certo limite. Este fato pode ser atribuído à complexidade dos açúcares que restam ao fim da fermentação. Açúcares de cadeia longa apresentam diferentes ligações glicose-glicose entre amilose ou açúcares simples. Dependendo da posição dessas ligações, esse açúcar pode ser não fermentescível para a levedura.

Cada levedura atenua açúcares de maneira característica. Leveduras do tipo ale, por exemplo, não são capazes de metabolizar a melibiose (glicose-galactose) e utilizam a maltotriose de maneira não eficiente (DEÁK, 2007). Esses açúcares residuais ficam presentes na cerveja, fazendo parte do complexo conjunto que gera o sabor e aroma característico de estilos de cervejas Ale (JASON, 1996). A levedura de estudo é caracterizada como uma levedura Ale, o que pode explicar os altos níveis de açúcares residuais.

Outra hipótese levantada foi a de que a atividade da levedura estava sofrendo uma inibição pelo etanol ou por algum metabólito secundário formado. Entretanto, para cada condição de fermentação, esse inibidor seria formado em momentos e quantidades diferentes. Nesse caso, à medida que o metabolismo da levedura fosse afetado a fermentação iria cessar. Esse efeito é diferente do que pode ser observado, pois em quase todas os experimentos a fermentação atingiu máxima atenuação pela levedura. Sendo assim, a hipótese de inibição foi descartada.

#### **4.4.1. Avaliação do perfil de concentração dos metabólitos voláteis durante a fermentação alcoólica**

No processo de fermentação alcoólica, o etanol é o metabólito volátil formado em maior abundância. Os níveis sensoriais de detecção de etanol na cerveja podem chegar a 17000 mg/L, enquanto alguns ésteres, por exemplo, chegam no máximo a 0,6 mg/L. Como citado, sabe-se que a temperatura e a quantidade de carbono disponíveis para o microrganismo afetam o crescimento bem como a formação dos demais metabólitos. Com os ensaios fermentativos realizados, isto foi mais uma vez confirmado. Como cada levedura gera uma resposta metabólica diferente perante a alteração das condições do meio, com os experimentos realizados, pôde-se avaliar como essas interferências ocorrem.

A levedura extraída da casca da jabuticaba, quando colocada em um meio fermentativo a 23 °C, já apresenta uma quantidade elevada de etanol nas primeiras 24 horas, 21,18 e 13,63 g/L, para F01 e F02, quando comparada aos ensaios conduzidos a temperaturas inferiores (Figura 18). Isso ocorreu porque o aumento de temperatura favorece o transporte de aminoácidos, leucina e isoleucina, para dentro da célula, aumentando a produção de etanol pela rota Ehrlich.

O ensaio com maior °Br inicial e temperatura mais baixa (F04) apresentou concentração final de etanol semelhante ao de temperatura mais alta para o mesmo °Br inicial (F01), o que pode ter ocorrido em função dos tempos de duração das fermentações. No ensaio F01 a levedura gerou etanol rapidamente. Por volta do quarto dia, o etanol, em concentrações elevadas, começou a ser consumido como fonte de carbono. Já no ensaio F04, a produção de etanol ocorreu lentamente, chegando a valores mais altos apenas no último dia de fermentação, que durou 2 dias a mais que a fermentação F01.

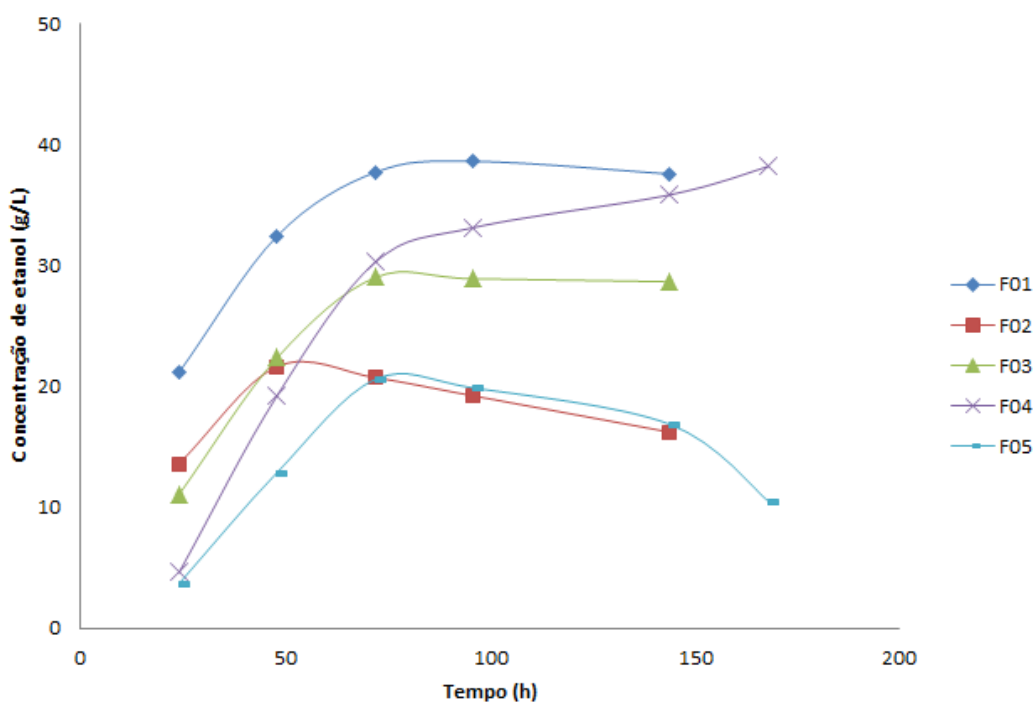


Figura 18. Perfis de concentração do etanol nas diferentes condições de fermentação (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).

No geral, o ensaio F01, com valores do ponto máximo para temperatura e °Brix inicial, apresentou o valor mais alto de etanol obtido dentre os experimentos, igual a 38,64 g/L, enquanto no ensaio F04 a concentração de etanol chegou a 38,22 g/L. A diferença entre os teores de etanol obtidos nos ensaios foi pequena, o que indica que o °Br inicial é uma variável mais influente na geração de etanol do que a temperatura. Mesmo a uma temperatura mais alta, com o °Br inicial baixo (F02), o etanol é também produzido rapidamente, porém logo consumido para suprir a falta de uma fonte de carbono no meio.

Em ambos os ensaios conduzidos no ponto de mínimo do °Br inicial, observa-se a partir do segundo e terceiro dia (F02 e F05) essa mesma queda no perfil de concentração de etanol, que pode ser atribuída à baixa quantidade de açúcar fermentescível disponível para levedura.

A utilização do etanol, como fonte de carbono ocorre quando os níveis de glicose estão muito baixos para geração de energia metabólica e crescimento celular. A levedura reprograma a expressão de genes envolvidos na glicogênese, expressando genes antes reprimidos, induzindo um atraso no ciclo celular. A célula passa de um

modo fermentativo para um não fermentativo de crescimento (TURCOTTE *et al.*, 2009).

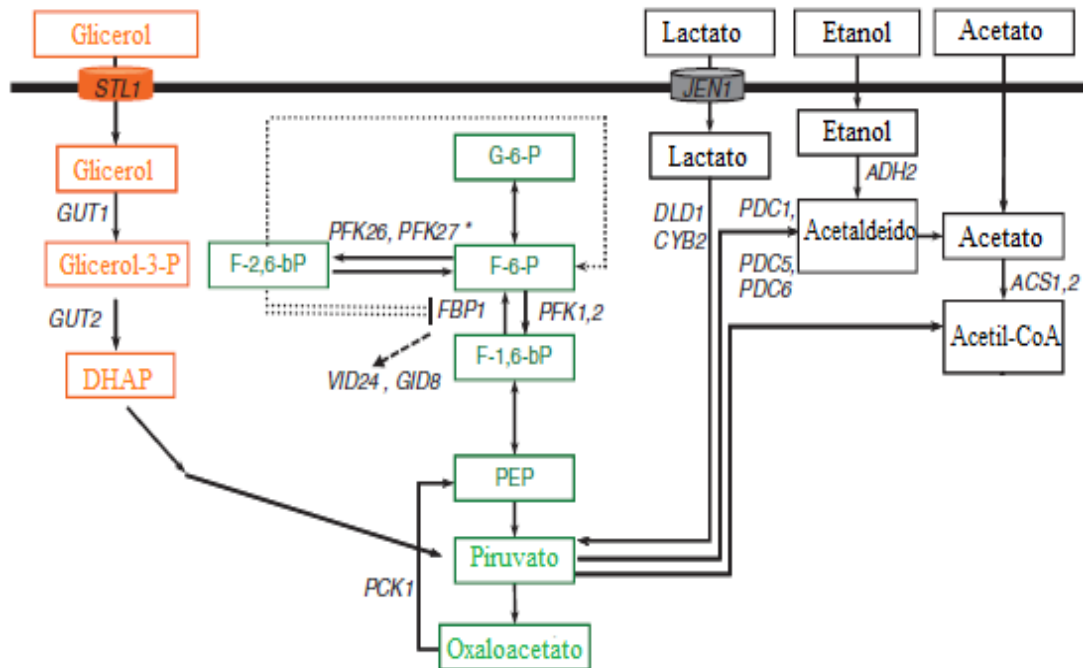


Figura 19. Rotas metabólicas e genes utilizados para regulação celular, utilizando fontes de carbono não fermentescíveis (TURCOTTE *et al.*, 2009).

O etanol entra na célula por difusão passiva e é metabolizado em acetaldeído pela etanol desidrogenase, que é posteriormente convertido em acetato, pela desidrogenase do acetaldeído, que por fim é transformado em Acetil-CoA, como ilustrado no esquema da Figura 19 (TURCOTTE *et al.*, 2009).

Uma consequência negativa da utilização do etanol como fonte de carbono no final da fermentação é que os níveis de acetaldeído aumentaram, à medida que o etanol era consumido nos ensaios F01 e F03, como pode ser observado nas Figuras 18 e 20. O aldeído é considerado um “*off-flavor*” quando acima do limite de detecção, gerando sabor de maçã verde. Assim, nos ensaios citados, a fermentação deveria ter sido interrompida no quarto dia, para evitar que o teor de aldeído aumentasse, já que no dia seguinte a este dia o °Brix já havia sido estabilizado.

Conclui-se também que temperaturas mais baixas geram um teor inicial de aldeído mais elevado, isso pode ser atribuído à lenta formação do etanol pela rota metabólica do glicerol, na qual o aldeído é formado primeiro. Porém, como age como

um intermediário para a formação de etanol, o perfil de concentração desse composto apresenta valores que flutuam até o fim da fermentação, terminando mais baixo no caso em que o etanol ainda era formado e mais alto nos ensaios em que o etanol já estava sendo consumido como fonte de carbono, como citado. Ensaios com menores teores de etanol apresentaram teores mais altos de aldeído.

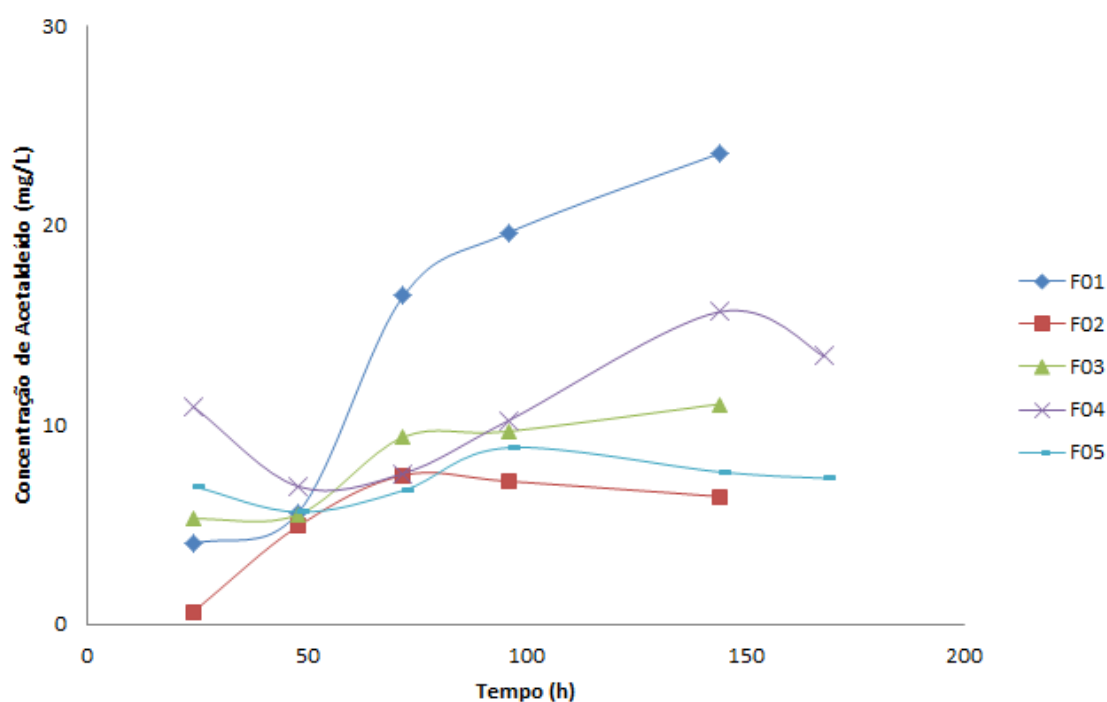


Figura 20. Concentrações do acetaldeído ao longo dos ensaios de fermentação em diferentes condições (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).

O efeito de combinação entre as variáveis em seus níveis máximos, no ensaio F01, gerou a concentração máxima de acetaldeído dentre as fermentações realizadas, igual a 23,62 mg/L, valor que se aproxima bastante do limite de detecção. Esse teor de aldeído elevado pode ser explicado pelo alto perfil de concentração de etanol durante toda a fermentação, durante todo o experimento havia muito aldeído, formando o etanol. Quando o teor devia se estabilizar, o teor de aldeído continuou aumentando devido à utilização da fonte não fermentável de carbono.

Os ensaios F02, F03 e F05 apresentaram valores para a concentração de aldeído no meio bem abaixo do limite de detecção sensorial, na faixa de 6,03 a 11,45 mg/L. Sendo assim, essas condições podem ser aplicadas quando se deseja evitar a presença de aldeído em grandes quantidades no produto final.

O segundo metabólito produzido em maior abundância, dentre os analisados, foi o álcool fenetílico. Este composto é um álcool superior com aroma de rosas e é formado por reações que ocorrem paralelamente à reação de formação do etanol, assim como outros álcoois superiores, que podem ser produzidos anabolicamente a partir da glicose ou catabolicamente pelos seus aminoácidos correspondentes pela rota de Ehrlich (REAZIN, *et al.*, 1970).

A produção catabólica dos álcoois ocorre porque essa é a via pela qual as leveduras obtêm nitrogênio a partir dos aminoácidos ramificados. A reação por vias anabólicas a partir do piruvato, gerado pelo consumo da glicose, só acontece quando o meio é suplementado com alguma fonte externa de nitrogênio, como, por exemplo, o amônio (DERRICK e LARGE, 1993).

Como dito anteriormente, o aumento na temperatura gera um aumento do transporte de aminoácidos para a célula, viabilizando a rota de Ehrlich, aumentando a concentração do álcool fenetílico no meio. Isto pode ser observado na Figura 21 com auxílio dos dados obtidos nos ensaios.

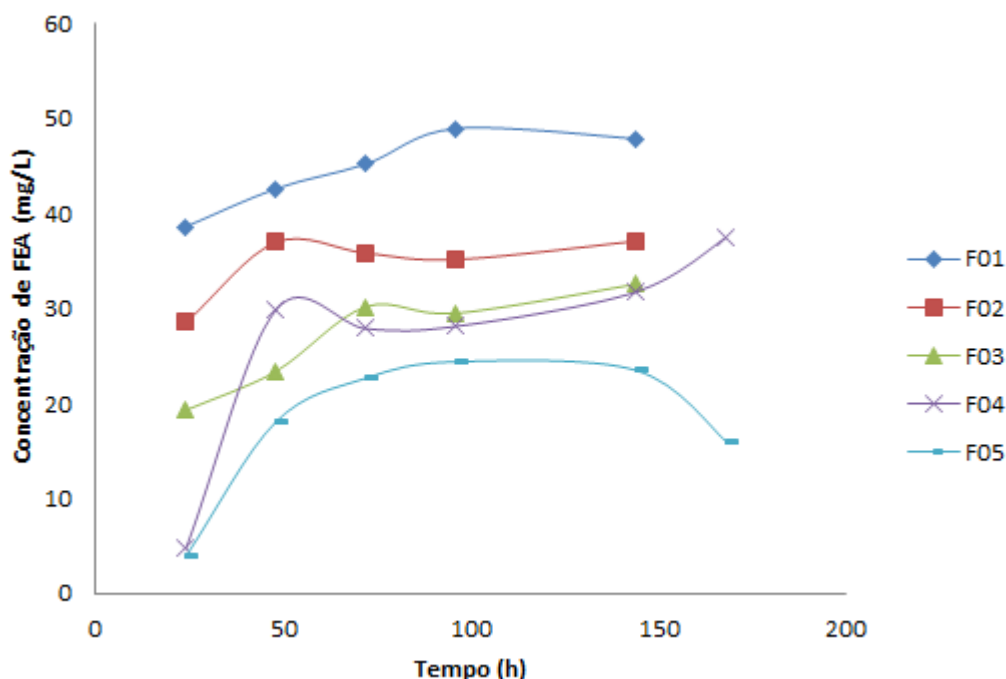


Figura 21. Perfis de concentração para o álcool fenetílico (FEA) nas diferentes condições de fermentação realizadas (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).

O teor de carbono do meio também afeta a formação desse composto. Pode-se observar que nas baixas temperaturas (F04 e F05) os níveis iniciais de álcoois são bem baixos. Entretanto, quando combinado a um alto °Br inicial (F04), a quantidade de álcool obtida no fim da fermentação, igual a 37,51 mg/L, é maior que a quantidade de álcool gerada no ensaio F02 (de maior T e menor °Br), igual a 32,46 mg/L. Algo semelhante ocorreu para a formação do etanol, porém com menor intensidade, já que os valores finais para o ensaio F01 e F04 foram bem distintos, iguais a 47,9 mg/L e 37,51 mg/L, respectivamente.

Além do tempo prolongado de fermentação para o ensaio F04, o aumento da concentração de álcool com o aumento do °Br inicial é decorrência das maiores quantidades de açúcares no meio disponíveis para serem consumidos pela levedura, o que regula o metabolismo da levedura, conseqüentemente, acelerando a fermentação. Neste caso, torna-se um pouco mais difícil de concluir qual variável é a mais influente na formação do composto. Comparando os ensaios F03 e F04, 32,59 mg/L e 37,51 mg/L, vê-se que um maior °Br gerou um pouco mais de álcool que temperatura mais alta. Dessa forma, assim como o etanol, o álcool fenetílico é mais influenciado pela quantidade de açúcares fermentescíveis.

Algo a que se deve atentar nas análises é o limite de detecção sensorial do composto no produto final. O álcool fenetílico pode estar presente na cerveja até um limite por volta de 40 mg/L; sendo assim, as condições dos ensaios F02, F03 e F05 mostram-se mais adequadas.

Outro álcool superior analisado foi o 2-metil-1-butanol (2m1b). Este álcool de cadeia ramificada intensifica o sabor alcoólico da cerveja e confere uma característica cálida a mesma, gerando um aroma floral e frutado. O 2m1b é um dos álcoois mais formado pelas leveduras utilizadas na fermentação alcoólica de cervejas e vinhos; Dessa forma, essa rota metabólica de formação é bem estabelecida (ver Figura 4 do capítulo 2).

Os perfis de concentração para este metabólito ao longo das fermentações realizadas são mostrados na Figura 22. Pode-se assim observar que a concentração do 2m1b varia de forma bem semelhante à do etanol. A temperatura e o °Br favorecem a formação do álcool e o °Br também parece afetar mais a formação desse composto do que a temperatura. Porém, particularmente neste caso, vê-se que a influência da temperatura é um pouco maior que na geração de etanol e um pouco menor que na geração no álcool fenetílico, quando comparada à influência do °Br.



No ensaio F01, o teor máximo de 2m1b atingido foi de 33,21 mg/L, estabilizando em um valor próximo de 31,34 mg/L. Já no experimento de menor temperatura e maior °Br, F04, a concentração de 2m1b crescem gradativamente até 25,61 mg/L. Todas as condições estudadas geraram níveis deste álcool dentro do limite de detecção sensorial; porém, os experimentos F04 e F05, apresentam teores muito baixos, o que pode afetar o equilíbrio final do sabor e aroma da cerveja almejada.

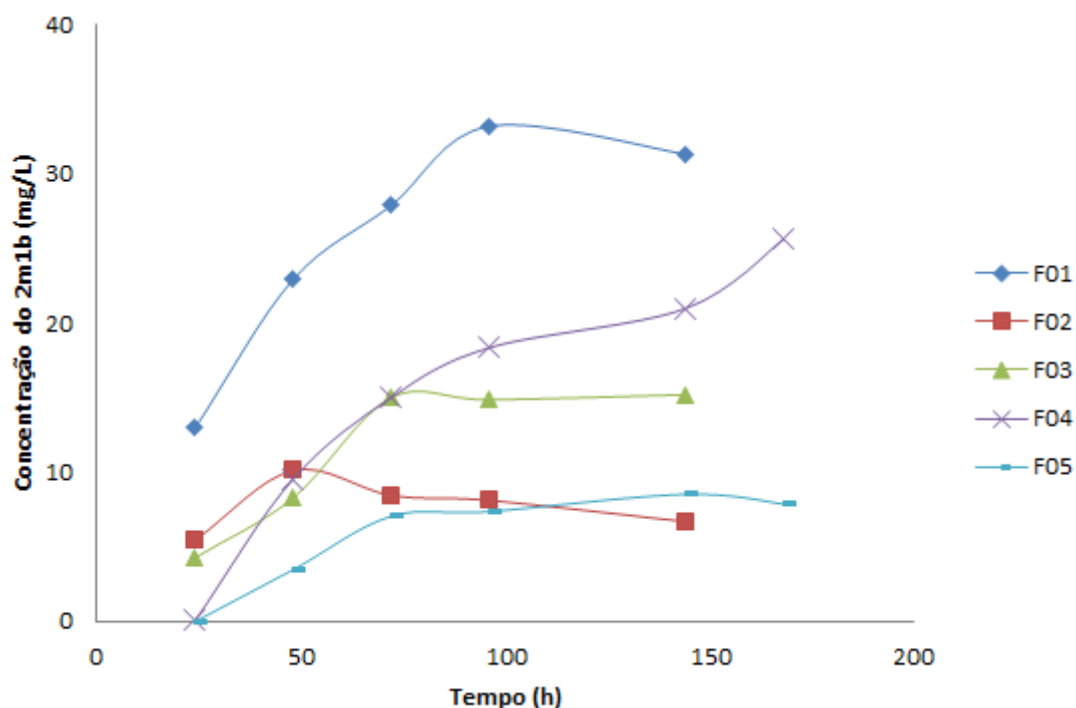


Figura 22. Concentração do 2-metil-1-butanol (2m1b) ao longo das fermentações nas diferentes condições experimentais utilizadas (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).

O último e não menos importante álcool superior estudado foi o triptofol. Este álcool é derivado de aminoácidos aromáticos e é produzido por microrganismos associados à fermentação vínica. O composto induz o sono em seres humanos e, se produzido em excesso, valores superiores ao do limite de detecção sensorial, pode gerar um sabor amargo na cerveja (MAS *et al.*, 2014). As concentrações obtidas ao longo dos diferentes ensaios fermentativos estão apresentadas na Figura 23.

O modo como a concentração do triptofol varia ao longo dos ensaios mostrou-se diferente do que foi visto anteriormente para os demais álcoois superiores. Nos ensaios

conduzidos com maiores teores de açúcar iniciais, F04 e F05, as concentrações começaram baixas; contudo, à medida que a fermentação ocorria, o nível de triptofol chegou às concentrações máximas finais. No ensaio F04, obtiveram-se 5,55 mg/L de triptofol ao fim da fermentação, enquanto no F05 a concentração chegou a 5,40 mg/L. Os valores foram bastante similares e deram a ideia de que o °Br afeta pouco a formação do composto.

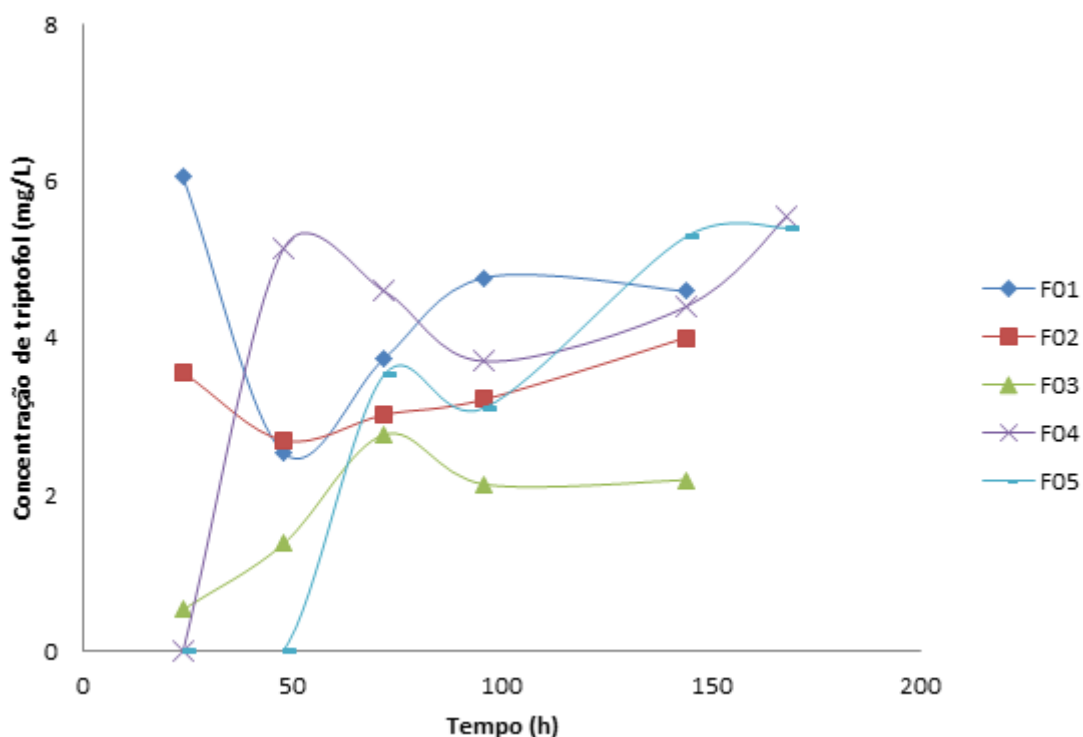


Figura 23. Perfil de concentração do triptofol nas diferentes condições de fermentação realizadas (F01, T=23°C e °Br=15; F02, T=23°C e °Br=10; F03, T=19°C e °Br=12,5; F04, T=15°C e °Br=15 e F05, T=15°C e °Br=10).

Quando são comparados os ensaios de mesmo °Br e diferentes temperaturas, F01 e F04, por exemplo, observa-se, no ensaio F01 que nas primeiras 24 horas de fermentação o triptofol é gerado em altas quantidades; porém, logo é consumido e o seu perfil oscila até uma concentração final de 4,6 mg/L. Esta concentração é menor que a obtida no ensaio F04, 5,55 mg/L, e menor também que a concentração obtida no ensaio F05, 5,4 mg/L, de menor temperatura e °Br. Este fato mostra que a temperatura interfere negativamente na formação deste álcool superior.

A via metabólica para a formação do triptofol como para os demais álcoois superiores, é a rota de Ehrlich. Entretanto, segundo SZLAVKO (1973), a decarboxilase do ácido 3-indole pirúvico é realizada por uma enzima separada e diferente da piruvato descarboxilase encontrada na formação dos demais álcoois. O motivo deste fato e quais efeitos causam não foram encontrados na literatura. Mas em trabalhos posteriores, a autora concluiu que um aumento na glicose do mosto, aumenta a quantidade de triptofol formado (SZLAVKO, 1974). Contudo, não há informações sobre como a temperatura afeta o nível desse composto ao final da fermentação. Uma hipótese levantada é que a mudança na rota metabólica citada possa ser viabilizada a baixas temperaturas, que por sua vez desfavorecem a ação das enzimas convencionais para a formação dos demais álcoois. Em trabalhos mais recentes, pesquisadores citaram que o mecanismo de formação do triptofol está ligado a uma mudança genética nas leveduras que o produzem, podendo variar de um microrganismo para outro, algo que dificulta a compreensão da relação entre temperatura e a concentração do metabólito na fermentação (MAS *et al.*, 2014).

Em geral, os níveis de triptofol encontrados estão bem abaixo do limite de detecção sensorial e próximos a valores encontrados em cervejas Ale comercializadas. Dessa forma, as condições utilizadas para formação desse composto podem ser consideradas apropriadas, dependendo da cerveja que se deseja produzir.

O éster identificado nas análises qualitativas e analisado quantitativamente em todas as cinco fermentações foi o acetato de isopentila. Este éster apresenta cheiro característico de banana e, como os demais ésteres, pode exercer grande impacto no sabor da cerveja. Quando em altas concentrações no produto final, os ésteres são considerados “*off-flavors*”. Contudo, se produzidos em baixas quantidades, além de trazer aromas agradáveis doces e frutais, amenizam o aspecto rançoso que pode ser notado com a presença de ácidos graxos, já que estes são consumidos na esterificação.

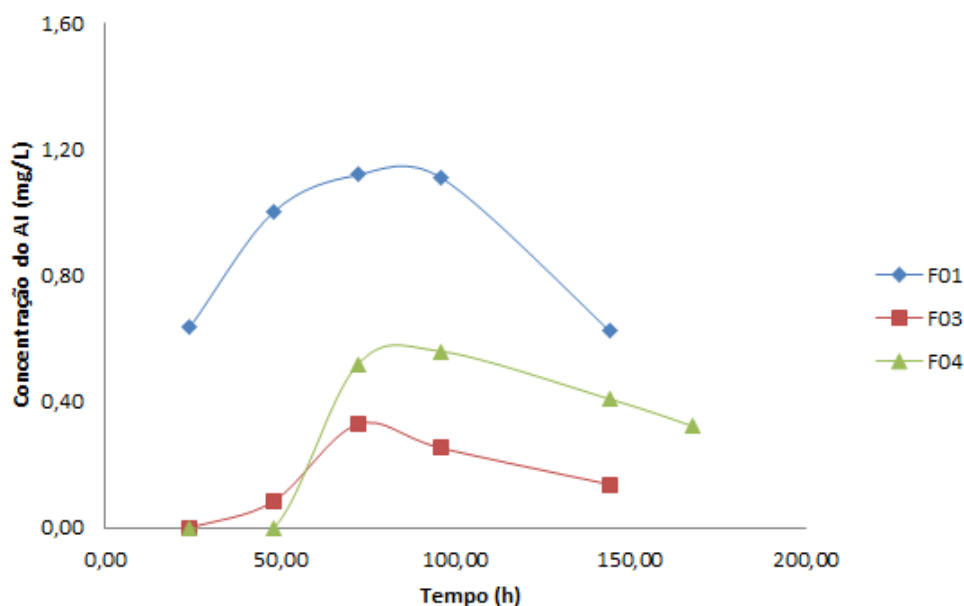


Figura 24. Valores de concentração para o acetato de isopentila (AI) ao longo dos ensaios de fermentação em apenas três (F01, T=23°C e °Br=15; F03, T=19°C e °Br=12,5 e F04, T=15°C) das cinco diferentes condições utilizadas.

Com auxílio dos perfis de concentração elaborados com os dados obtidos, mostrados na Figura 24, pode-se notar, comparando-se os ensaios F04 e F03, conduzido a uma temperatura mais alta, porém menor °Br, a grande influência que o °Br exerce sobre a formação do éster. No ensaio F04 o nível de éster chegou a 0,41 mg/L, superando o nível do ensaio F03, que atingiu 0,14 mg/L. Conclui-se assim que, quanto maior é o °Br, maior é a produção do acetato de isopentila. Nos ensaios de ponto mínimo de °Br inicial, 10°Br, o éster não atingiu concentrações necessárias para detecção no GC pelo método proposto, não aparecendo no perfil.

Os ésteres de acetato são formados na fermentação alcoólica por meio da esterificação (ver Figura 6). Essa reação combina o etanol ou um álcool superior com a coenzima A e é catalisada pela acetato transferase (AAT). Como dito, um aumento na concentração de carbonos no mosto regulariza o metabolismo celular, viabilizando a produção dessa enzima e conseqüentemente, aumentando o nível de ésteres formados (ENGAN, 1970).

A maior concentração de éster obtida foi no ensaio F01, que combina uma maior temperatura com um maior °Br inicial. O teor do éster chegou a 0,63 mg/L neste ensaio, mostrando que o aumento na temperatura também favorece a formação dos ésteres de acetato. Este fato deve-se ao efeito do aumento na temperatura viabilizar a formação de

álcoois e a consequente formação de ésteres. Além disso, a alta temperatura torna a membrana, em que se liga a AAT, mais fluída, liberando-a no meio, aumentando sua atividade e acelerando a formação de ésteres (PEDDIE, 1990). A cepa de levedura utilizada também influencia a formação desses metabólitos. Como a enzima que catalisa a esterificação, AAT, está ligada à membrana celular da levedura, quanto mais a espécie possuir AAT, mais ésteres ela é propensa a formar. Leveduras Ale, normalmente produzem ésteres, que já são pouco ou não encontrados em cervejas produzidas por uma levedura Lager (ENGAN, 1970). Este é mais um indício de que a levedura estudada é do tipo Ale.

#### **4.4.2. Avaliação da estabilização dos metabólitos ao fim da maturação**

É muito importante estabelecer o tipo de cerveja que se deseja produzir, para inferir sobre as melhores condições para gerar um produto final equilibrado nos metabólitos estudados. Além disso, o processo de produção de cerveja não para na fermentação. Após esta etapa, um processo de maturação é realizado almejando a estabilização dos metabólitos formados na etapa anterior e a sedimentação de detritos sólidos e de leveduras que tenham ficado em suspensão.

Uma tabela, com os valores de concentração dos metabólitos obtidos ao fim das etapas de fermentação e de maturação foi elaborada com a finalidade de observar se há mudanças significativas de uma etapa para outra (Tabela 7). Avalia-se, assim, se o controle da fermentação torna possível obter uma concentração final desejada dos componentes. Em geral, para todos os metabólitos, com exceção do acetaldeído, as concentrações no fim da maturação se estabilizaram em valores inferiores ou muito próximos aos teores observados ao final da fermentação. Isso indica que controlando, a etapa de fermentação, pode-se obter uma quantidade desejada de um certo metabólito no produto final.

Para o etanol, todas as concentrações diminuíram um pouco na maturação, exceto no ensaio F03, em que houve um aumento proporcional à diminuição notada nas demais condições. Em contrapartida, para o acetaldeído, todas as concentrações aumentaram significativamente na maturação, chegando a ultrapassar o limite de detecção nos ensaios F01 e F04. Para este metabólito, a condição F03 foi aquela em que o aumento do teor do composto foi menos significativo.

Tabela 7. Valores de concentração final para os metabólitos voláteis estudados nas etapas de fermentação e maturação.

Metabólito	Condições	Concentração final (mg/L)	
		Fermentação	Maturação
Etanol	F01	37590,21	36799,84
	F02	16243,53	15564,80
	F03	28680,85	30425,01
	F04	38221,03	37559,29
	F05	10526,32	10188,19
Acetaldeído	F01	23,62	32,83
	F02	6,43	11,48
	F03	11,05	14,30
	F04	13,46	27,86
	F05	7,34	14,77
Álcool Fenético	F01	47,91	45,71
	F02	37,12	32,46
	F03	32,59	32,31
	F04	37,51	37,52
	F05	26,05	26,80
2m1b	F01	31,34	27,94
	F02	6,71	5,40
	F03	15,21	16,50
	F04	25,61	25,86
	F05	7,89	7,31
Tryptofol	F01	4,60	3,06
	F02	4,01	1,22
	F03	2,19	2,76
	F04	5,55	5,87
	F05	5,40	5,29
AI	F01	0,63	0,07
	F03	0,14	0,00
	F04	0,32	0,17

Uma hipótese que pode explicar o ocorrido é que se o etanol, presente na cerveja, entrar em contato com o oxigênio do meio após a fermentação, ele pode ser oxidado e formar aldeído e água, diminuindo a concentração do álcool e aumentando a formação do aldeído a níveis indesejáveis. Para evitar que isso ocorra, a maturação deve ocorrer a temperaturas intermediárias, por volta de 10 °C, para uma levedura Ale, a fim de que a levedura continue metabolizando esse aldeído a álcoois, mesmo que de forma lenta, até que o composto seja em sua maioria consumido. Após um período de 7 a 10 dias é que a temperatura deve ser diminuída a 0 °C para sedimentação das leveduras. O processo deve ocorrer sem que haja oxigenação da cerveja.

#### **4.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os dados obtidos com a realização dos ensaios propostos pelo planejamento experimental foram analisados estatisticamente para que mais informações sobre o sistema pudessem ser levantadas e um modelo empírico para cada metabólito fosse formulado. As primeiras manipulações estatísticas realizadas foram o cálculo da média e variância, levando em conta as 10 réplicas de cada experimento. Os valores de média e variância para cada condição de fermentação, juntamente com os dados gerais, estão apresentadas no Apêndice B.

Com os valores de média, variância amostral e conhecendo o número de réplicas dos experimentos, o teste t de student pôde ser empregado, para que o intervalo em que a média verdadeira se encontra fosse estabelecido. As Equações (1) a (4) (capítulo 2) foram aplicadas e um intervalo de confiança de 95% foi assumido para os cálculos.

A Figura 25 mostra em um gráfico de sobreposições, como a concentração de etanol varia, levando em conta as 10 réplicas realizadas para cada condição experimental. Com o auxílio dos intervalos de confiança da média calculados com o teste t, pode-se ver que a amplitude do intervalo de confiança varia não só com o tempo, mas também com a condição experimental utilizada. Nos ensaios conduzidos a temperaturas mais baixas, F04 e F05, nota-se que o intervalo começa menor e que à medida que a concentração de etanol aumenta, a amplitude do intervalo também aumenta, voltando a diminuir ao fim da fermentação. Esta variação do erro ao longo do

tempo é muito interessante, pois pode estar relacionada com a cinética da fermentação alcoólica.

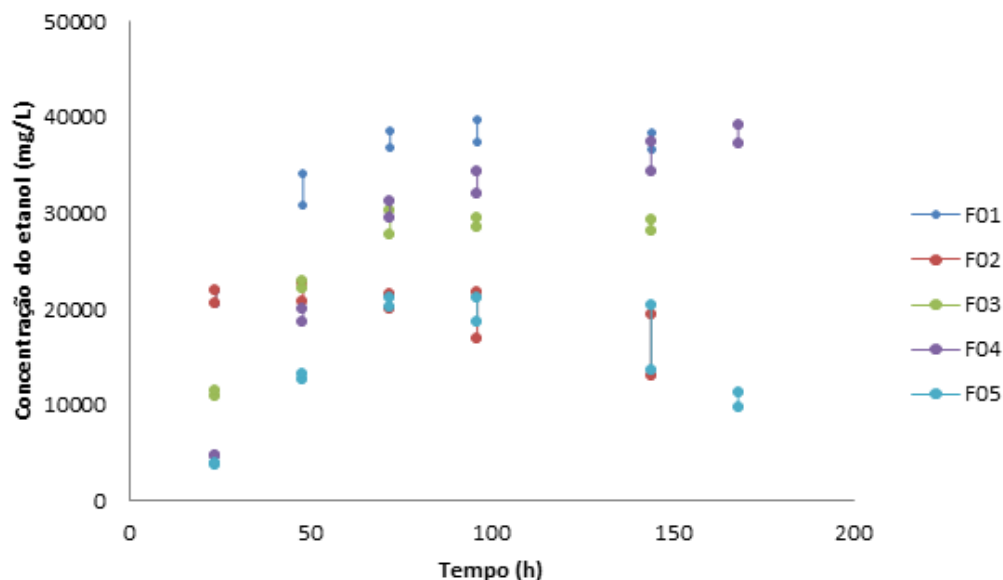


Figura 25. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração do etanol nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.

Temperaturas mais elevadas aceleram muito o metabolismo fermentativo das leveduras. Ao mesmo tempo em que estão sendo formados, os metabólitos já começam a ser consumidos, o que pode dificultar a análise de como o erro varia ao longo do tempo e a associação desse fato com a cinética de fermentação ou aumento de concentração dos compostos no meio. Isso é particularmente verdadeiro no caso do etanol que é produzido em elevadas quantidades.

As variações das médias para o 2m1b ao longo do tempo e para todas as condições de fermentação, apresentadas na Figura 26, mostram um comportamento semelhante ao do etanol. Nas fermentações com a temperatura de 19°C, o intervalo de confiança começa bem pequeno e aumenta com o tempo, diminuindo novamente no fim do processo. Já nos outros ensaios fica difícil notar algum padrão na variação, embora variações sempre estejam presentes.



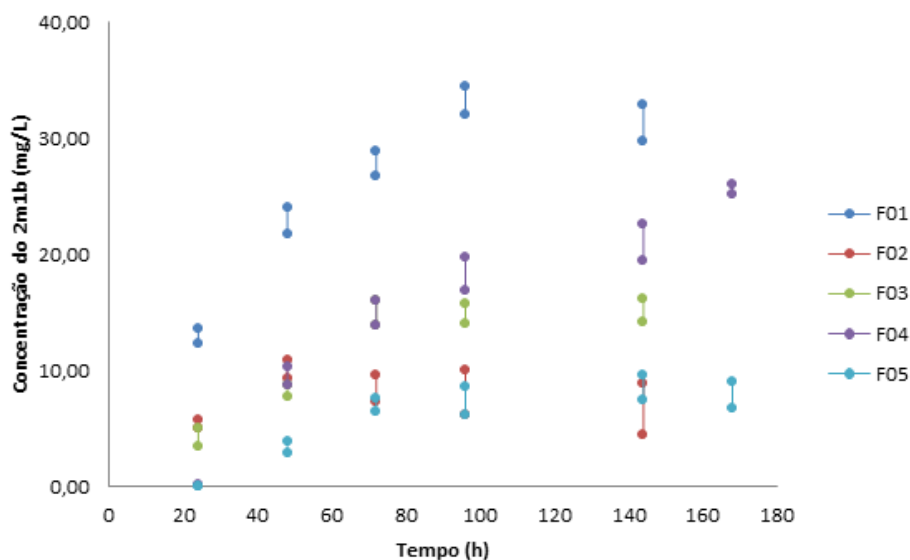


Figura 26. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de 2m1b nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.

O fato de haver semelhanças na variação do intervalo de confiança para esses álcoois pode significar que eles estão conectados e que as informações estatísticas obtidas carregam informações sobre as vias metabólicas do processo. Como visto anteriormente, a formação do 2m1b, um álcool superior, ocorre paralelamente à geração de etanol, o que pode explicar o comportamento observado.

Os demais metabólitos não parecem apresentar padrão estabelecido de variações, para nenhum dos ensaios, no que diz respeito à variação da amplitude do intervalo de confiança. Uma hipótese para a ocorrência desse fato é que esses metabólitos possuem rotas metabólicas mais complexas o que dificulta avaliar qualquer relação entre os erros de medida e a formação das variáveis, por meio deste teste. Em outras palavras, as flutuações podem ser regidas principalmente pelo erro experimental de medição e não pelas correlações induzidas pelo mecanismo. As demais sobreposições de intervalos de confiança das médias oriundas do teste t de student, para o acetaldeído, triptofol, álcool fenetílico e acetato de isopentila, estão dispostos nas Figuras de 27 a 30 a seguir.

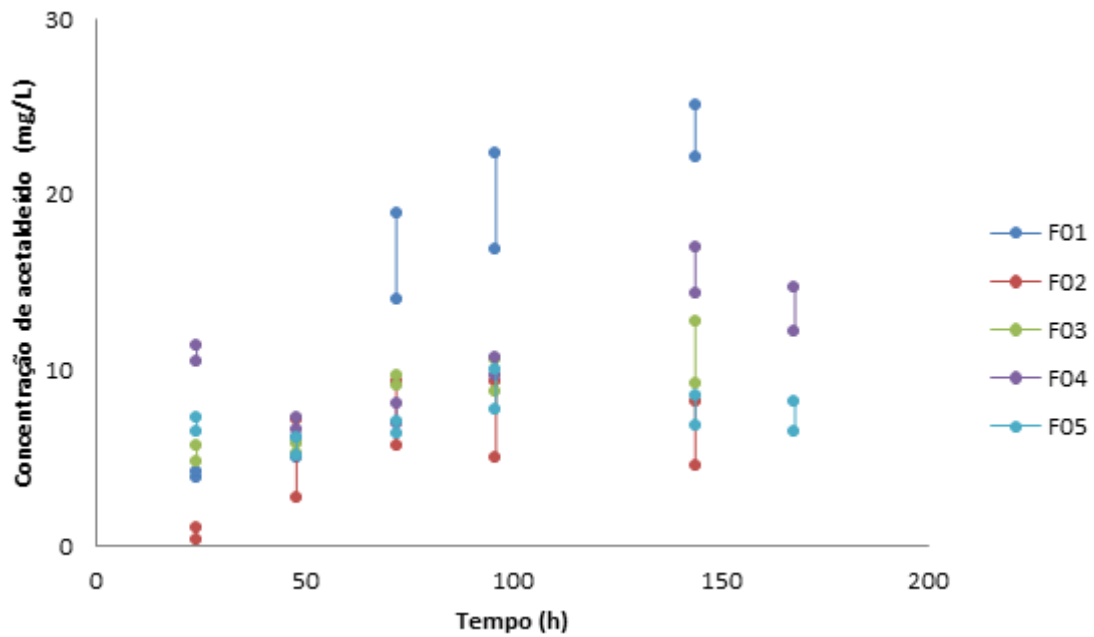


Figura 27. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de acetaldeído nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.

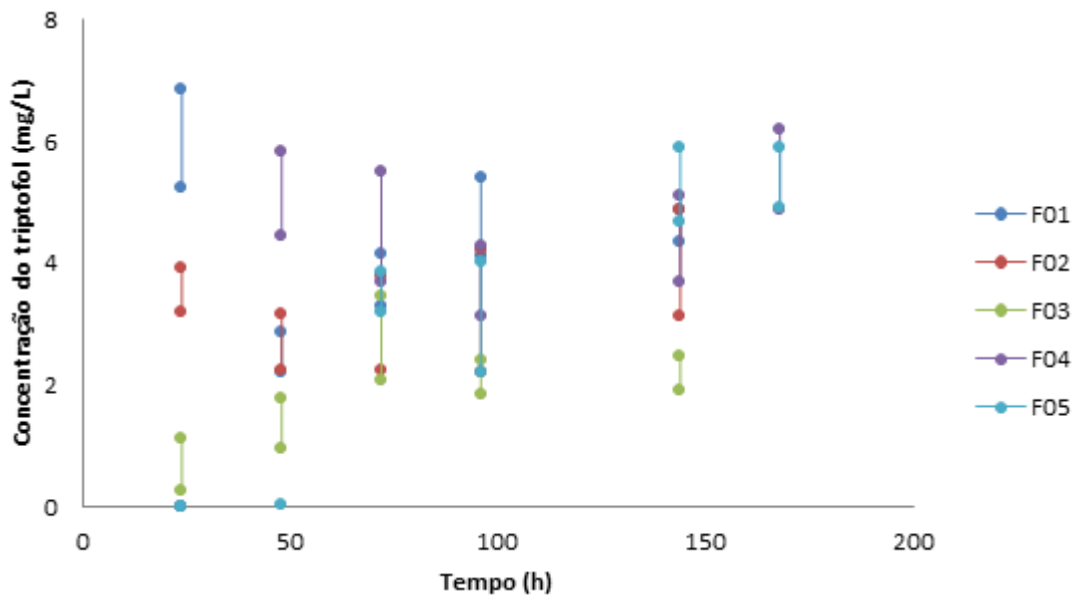


Figura 28. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de triptofol nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.

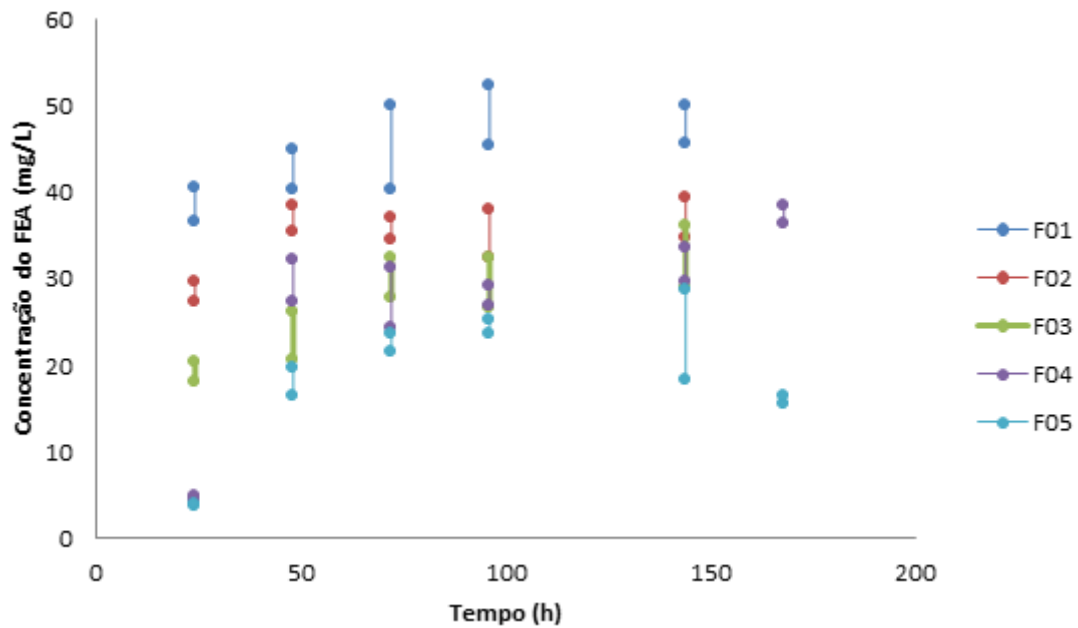


Figura 29. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de álcool fenetílico (FEA) nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.

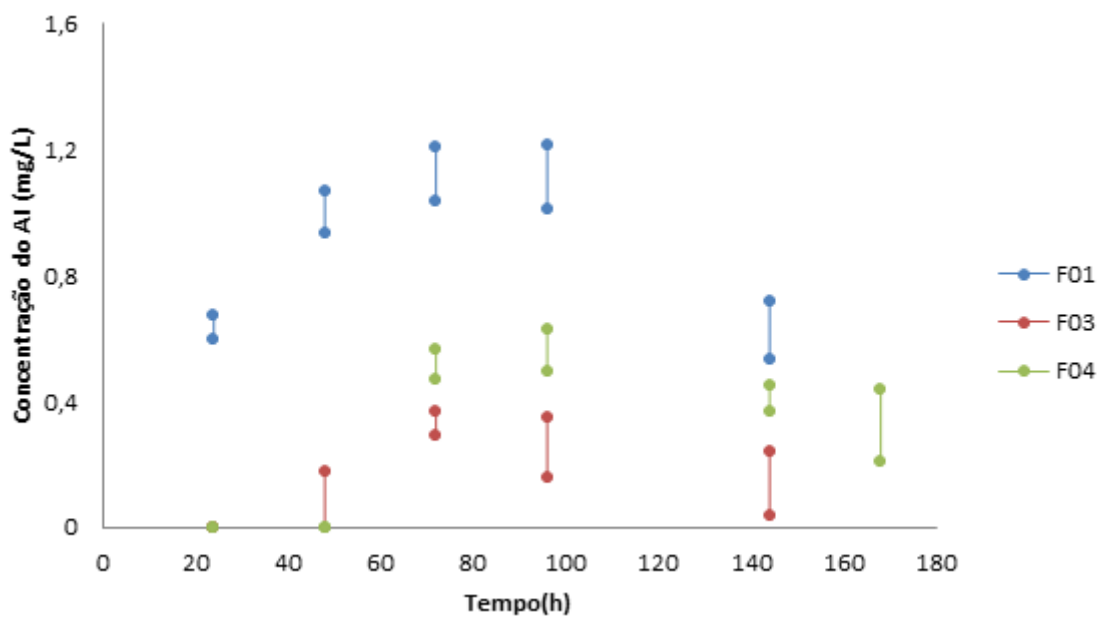


Figura 30. Sobreposição dos intervalos de confiança para a média amostral da concentração de acetato de isopentila (AI) nas cinco condições de fermentação, obtidos pelo teste t de Student.

É importante perceber que o fato dos intervalos de confiança das médias não se sobreporem indica que as variáveis não são estatisticamente equivalentes, sendo

provavelmente resultantes das perturbações do plano experimental. Portanto, as medidas parecem ser sensíveis às variações impostas pelo plano, justificando o esforço posterior de modelagem.

Para inferir sobre as variâncias amostrais dos experimentos e observar como elas variam, aplicou-se o teste F de Fisher, utilizando as Equações de (5) a (7) (capítulo 2) e considerando o intervalo de confiança de 95%. A Figura 31 mostra o gráfico que representa o teste F para as medidas de concentração de etanol em todas as fermentações realizadas. As linhas verticais pretas são os limites  $F_1$  e  $F_2$  do teste e os pontos azuis representam os valores obtidos de F, tendo como referência a variância do primeiro ponto da primeira condição, F01.

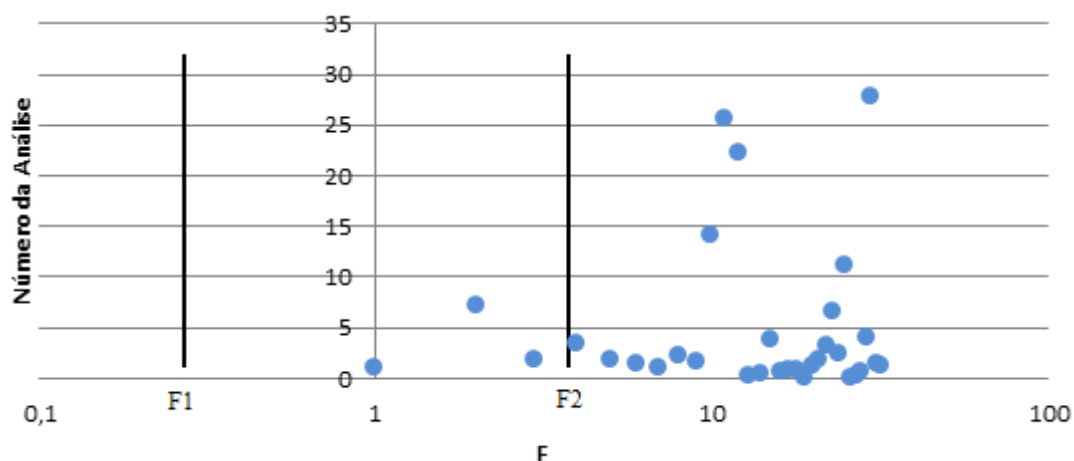


Figura 31. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de etanol em todas as condições de fermentação.

Como pode ser observado, apenas três pontos dos testes estão dentro do intervalo de confiança do teste F, incluindo o ponto que representa a referência dividida por ela mesma. Isso significa que, como a média, a variância amostral também varia ao longo do tempo e das condições experimentais de fermentação. Dessa forma, descarta-se a hipótese de que os erros do sistema sejam apenas erros analíticos de medição, uma vez que nos casos em que os erros analíticos controlam, as variâncias são similares, não variando muito com diferentes condições experimentais. O sistema é dito heterocedástico, pois apresenta variâncias que mudam na região de experimentação.

A mudança observada no intervalo das variâncias amostrais para as diferentes condições fermentativas foi notada não só para o etanol, mas para todas as demais variáveis, como pode ser observado nas Figuras 32 a 36.

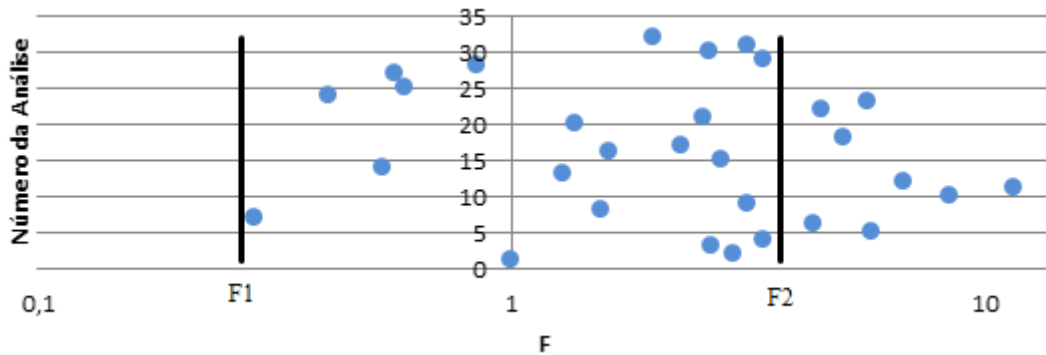


Figura 32. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de 2-metil-1-butanol em todas as condições de fermentação.

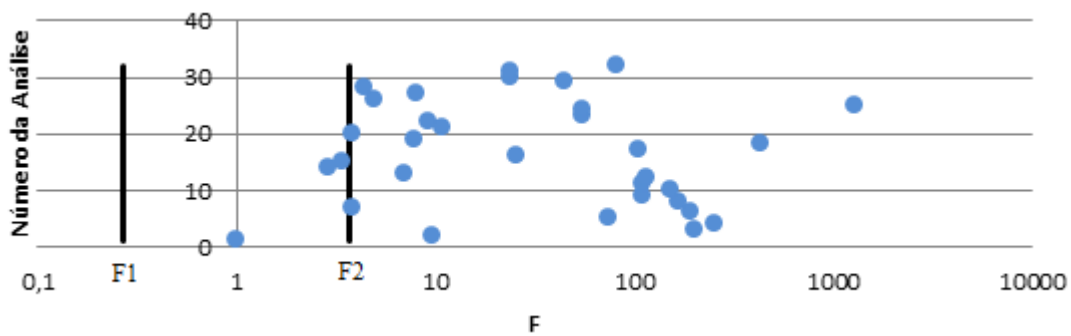


Figura 33. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de acetaldeído em todas as condições de fermentação.

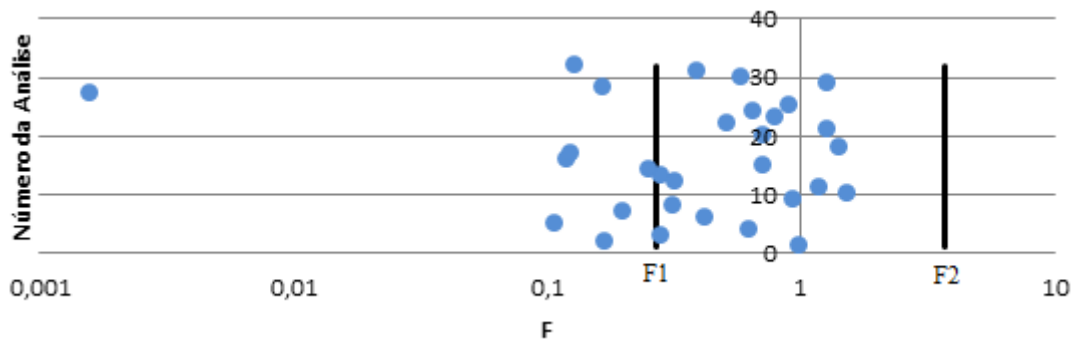


Figura 34. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de triptofol em todas as condições de fermentação.

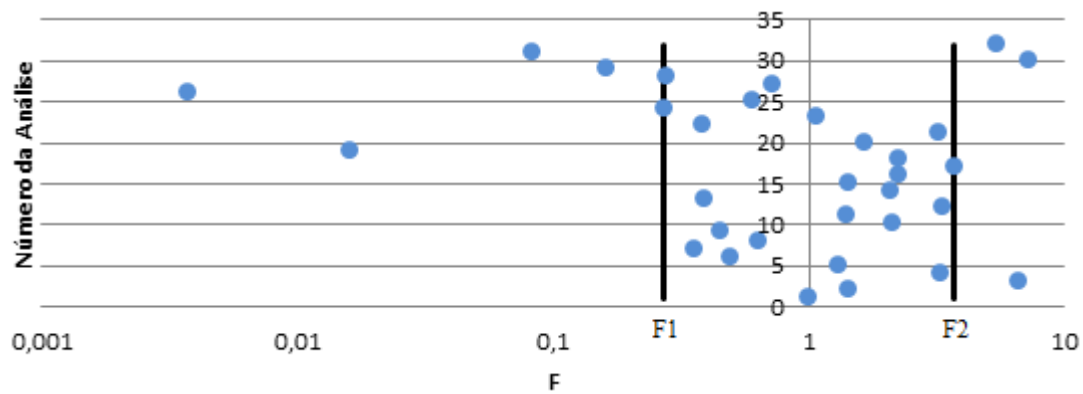


Figura 35. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de álcool fenético em todas as condições de fermentação.

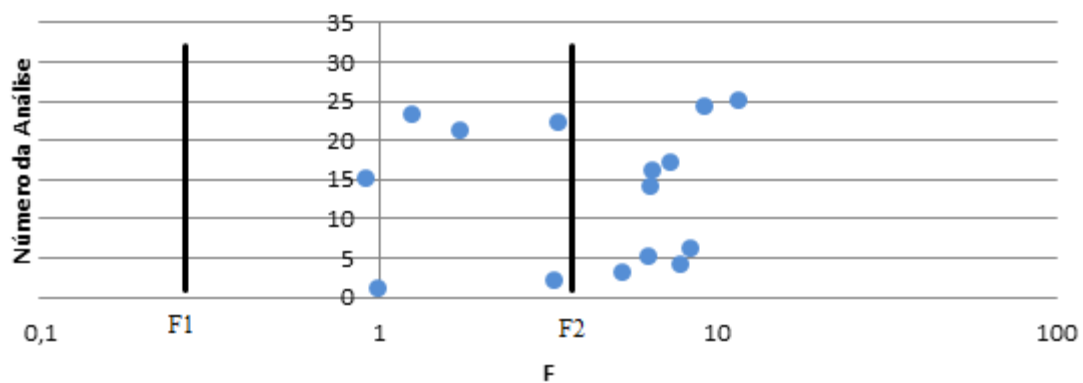


Figura 36. Teste F de Fisher aplicado às variâncias da concentração de acetato de Isopentila em todas as condições de fermentação.

Da análise realizada, com auxílio dos testes t e F, pode-se concluir que, devido às variações significativas da média e da variância dos dados com o tempo e para as diferentes condições de fermentação, uma modelagem cinética do problema pode e deve ser proposta. A modelagem empírica dos dados para cada variável viabilizará uma melhor visualização das tendências do processo.

#### 4.5.1. Análises das matrizes de correlação

Outra forma de avaliar como as variáveis estão relacionadas em função do tempo e das condições experimentais faz uso de matrizes de correlações dos dados.

Primeiramente, as matrizes foram compostas os dados diários de cada fermentação realizada, a fim de avaliar como dentro de cada condição experimental aquelas variáveis se relacionam ao longo do tempo. Em seguida, matrizes de correlação para cada condição de fermentação, foram elaboradas com o intuito de obter informações de como as diferentes condições afetam a intensidade com que as variáveis se relacionam. Por fim, uma matriz de correlação global, englobando todos os dados de todos os experimentos, foi calculada, com o intuito de averiguar se havia alguma correlação significativa no conjunto da faixa experimental.

As correlações foram obtidas utilizando o software StatSoft STATISTICA v8.0 e somente foram consideradas relevantes quando apresentaram valores iguais ou superiores a 0,7. Analisando as correlações calculadas diariamente para a primeira condição, F01, pode-se notar que a correlação entre o etanol e o 2m1b, para os três primeiros dias, começa pouco relevante, mas que, aumenta à medida que o tempo de fermentação vai aumentando. A Tabela 8 mostra os valores para correlação dessas variáveis.

Tabela 8. Valores de correlação entre o etanol e o 2m1b obtidos das matrizes de correlação diárias da condição F01.

<b>F01</b>	
<b>Tempo (h)</b>	<b>Correlação Etanol x 2m1b</b>
24	0,64
48	0,70
72	0,75
96	0,50
144	0,91

O mesmo fato pode ser observado para o ensaio F04, mostrado Tabela 9. De maneira muito similar, a correlação entre essas variáveis começa bem baixa, aumenta até o terceiro dia, é reduzida no quarto dia de fermentação, atinge um valor máximo no quinto dia, voltando a diminuir nas últimas 24 horas (vale ressaltar que essa fermentação durou um dia a mais).

Tabela 9. Valores de correlação entre o etanol e o 2m1b obtidos das matrizes de correlação diárias da condição F04.

F04	
Tempo (h)	Correlação Etanol x 2m1b
24	0,19
48	0,84
72	0,93
96	0,55
144	0,95
168	0,48

Essas fermentações têm em comum o ponto máximo para o °Br e foram também as condições nas quais as variáveis foram formadas em concentrações mais elevadas, o que pode ter viabilizado a detecção de alguma correlação entre as variáveis. Para entender melhor como o 2m1b e o etanol estão correlacionados ao longo do tempo, um gráfico para cada condição contendo a sobreposição dos perfis de concentração (médias) dos compostos foram elaborados como pode ser observado nas Figuras 37 e 38.

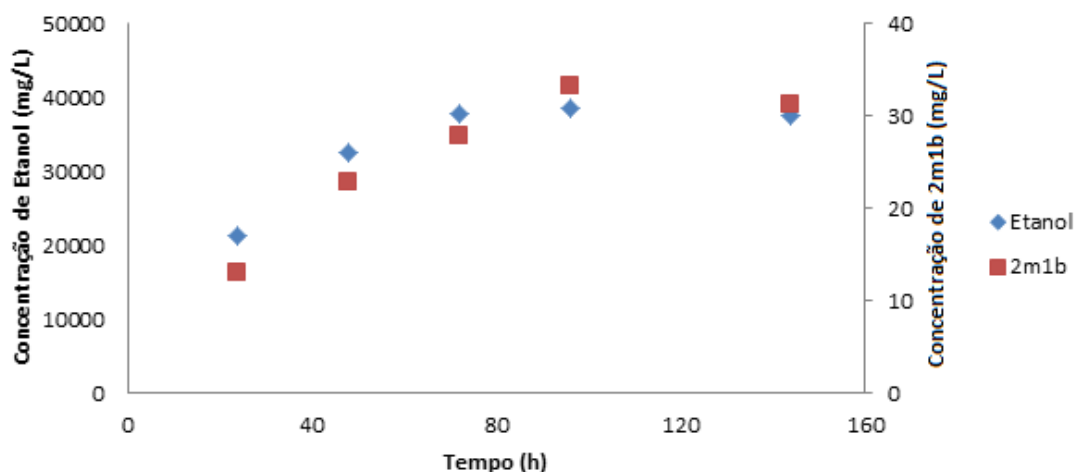


Figura 37. Sobreposição dos perfis de concentração do etanol e do 2m1b para a condição F01.



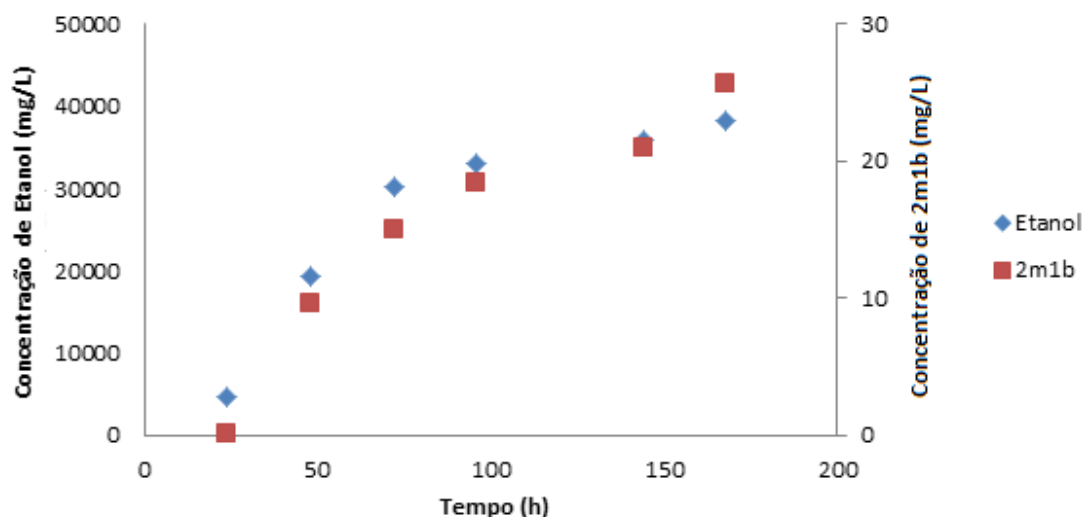


Figura 38. Sobreposição dos perfis de concentração do etanol e do 2m1b para a condição F04.

Por meio da sobreposição dos perfis de concentração, pode-se concluir que as formações dos dois metabólitos estão correlacionadas, podendo estar havendo acoplamento entre as rotas de biossíntese de ambos ou do 2m1b e do crescimento celular, já que a formação de etanol é acoplada ao crescimento celular também. No quarto dia de fermentação do experimento F04, o etanol é utilizado como fonte de carbono para a levedura, sendo responsável por algumas mudanças no metabolismo celular, o que explicaria a redução no nível de correlação entre as variáveis, que se estabiliza num momento seguinte, voltando a aumentar, à medida que a se adapta ao metabolismo modificado. Quanto mais esses metabólitos são produzidos e estão em maiores concentrações no meio, mais intensa é a relação metabólica e estatística entre eles.

Um gráfico relacionando o coeficiente de correlação com o tempo de fermentação foi elaborado para mostrar que as variações do experimento trazem informações sobre a cinética do problema. Deve ser observado o mesmo comportamento qualitativo, que permite supor que o fenômeno observado não é aleatório e que reflete algum efeito cinético.

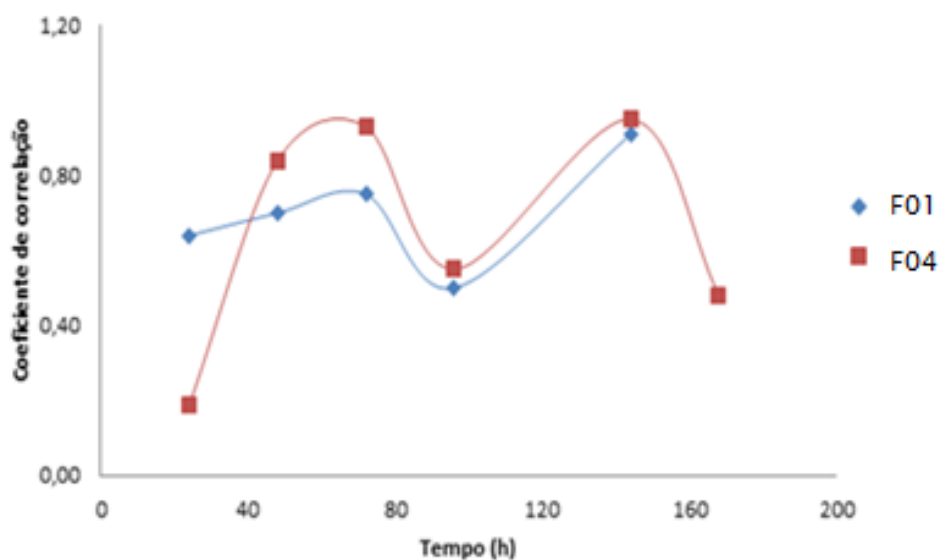


Figura 39. Variação dinâmica dos coeficientes de correlação entre o etanol e o 2m1b.

Observando as correlações gerais realizadas para cada condição, como mostrado nas Tabelas 10 a 12, uma tendência também pode ser observada. Para a maioria das condições há correlação entre o etanol e o 2m1b, com exceção da condição de temperatura e °Br mais baixos, F05.

Tabela 10. Matrizes de correlação geral para as condições F01 e F02.

Correlação F01						
	Et	2m1b	Acet	Trip	FEA	AI
Et	1,00	<b>0,95</b>	0,66	-0,38	0,65	0,15
2m1b	<b>0,95</b>	1,00	0,67	-0,23	0,68	0,18
Acet	0,66	0,67	1,00	-0,22	0,42	-0,53
Trip	-0,38	-0,23	-0,22	1,00	-0,10	0,07
FEA	0,65	0,68	0,42	-0,10	1,00	0,13
AI	0,15	0,18	-0,53	0,07	0,13	1,00
Correlação F02						
	Et	2m1b	Acet	Trip	FEA	AI
Et	1,00	<b>0,72</b>	-0,12	0,14	-0,11	-
2m1b	<b>0,72</b>	1,00	0,23	0,08	0,31	-
Acet	-0,12	0,23	1,00	-0,38	0,21	-
Trip	0,14	0,08	-0,38	1,00	0,24	-
FEA	-0,11	0,31	0,21	0,24	1,00	-
AI	-	-	-	-	-	1,00

Tabela 11. Matrizes de correlação geral para as condições de F03 e F04

Correlação F03						
	Et	2m1b	Acet	Trip	FEA	AI
Et	1,00	<b>0,94</b>	0,65	0,66	<b>0,77</b>	0,41
2m1b	<b>0,94</b>	1,00	<b>0,77</b>	<b>0,75</b>	<b>0,85</b>	0,43
Acet	0,65	<b>0,77</b>	1,00	0,60	0,69	0,08
Trip	0,66	<b>0,75</b>	0,60	1,00	0,63	0,38
FEA	<b>0,77</b>	<b>0,85</b>	0,69	0,63	1,00	0,43
AI	0,41	0,43	0,08	0,38	0,43	1,00

Correlação F04						
	Et	2m1b	Acet	Trip	FEA	AI
Et	1,00	<b>0,97</b>	0,41	<b>0,77</b>	<b>0,88</b>	0,60
2m1b	<b>0,97</b>	1,00	0,52	<b>0,77</b>	<b>0,89</b>	0,48
Acet	0,41	0,52	1,00	0,31	0,36	-0,05
Trip	<b>0,77</b>	<b>0,77</b>	0,31	1,00	<b>0,89</b>	0,26
FEA	<b>0,88</b>	<b>0,89</b>	0,36	<b>0,89</b>	1,00	0,36
AI	0,60	0,48	-0,05	0,26	0,36	1,00

Tabela 12. Matriz de correlação geral para a condição F05.

Correlação F05						
	Et	2m1b	Acet	Trip	FEA	AI
Et	1,00	0,61	-0,10	0,32	0,71	-
2m1b	0,61	1,00	0,32	<b>0,85</b>	0,68	-
Acet	-0,10	0,32	1,00	0,45	0,34	-
Trip	0,32	<b>0,85</b>	0,45	1,00	0,57	-
FEA	0,71	0,68	0,34	0,57	1,00	-
AI	-	-	-	-	-	1,00

A correlação varia não só com o tempo de fermentação, mas também com o aumento do °Br e a diminuição da temperatura. Por exemplo, os ensaios F01 e F04, apresenta valor máximo de °Br, porém apresentam valores máximo e mínimo de temperatura, respectivamente. A correlação geral no ensaio F01, 0,95, é um pouco menor que no ensaio F04, 0,97. No ensaio F03, o ponto central, observou-se uma correlação um pouco mais baixa que nos casos citados. Apesar de ter ocorrido uma diminuição na temperatura, também houve redução no °Br, o que pode ter afetado mais a correlação.

De uma forma geral, com a diminuição da temperatura e o aumento no °Br inicial, observou-se um aumento no número de correlações significativas entre as variáveis. Isso pode ser justificado pelo fato de, haver mais equilíbrio na formação dos metabólitos, já que a uma temperatura mais baixa, os metabólitos são formados mais lentamente, e as rotas de biossíntese podem ser diferenciadas mais eficientemente. Algo que também pode ser observado é o fato que as correlações que surgiram nas condições F03 e F04, foram em sua maioria entre os álcoois superiores, o que pode indicar uma relação metabólica. Isso faz muito sentido, já que a maioria dos álcoois superiores é formada pela via de Ehrlich.

Apesar de informar pouco sobre o processo, já que leva em conta todos os dados de todas as condições experimentais simultaneamente, a matriz de correlações global também confirmou a forte correlação entre o etanol e o 2m1b, reforçando os resultados antes obtidos e as possíveis hipóteses levantadas. Essa matriz pode ser vista na Tabela 13. As demais correlações ficam menos relevantes, indicando que os efeitos experimentais sobre as diferentes variáveis medidas são distintos.

Tabela 13. Matriz de correlações global entre as variáveis.

Correlação Global						
	Et	2m1b	Acet	Trip	FEA	AI
Et	1,00	<b>0,92</b>	0,55	0,40	<b>0,75</b>	0,63
2m1b	<b>0,92</b>	1,00	0,68	0,46	<b>0,76</b>	<b>0,72</b>
Acet	0,55	0,68	1,00	0,24	0,43	0,23
Trip	0,40	0,46	0,24	1,00	0,46	0,27
FEA	<b>0,75</b>	<b>0,76</b>	0,43	0,46	1,00	0,55
AI	0,63	<b>0,72</b>	0,23	0,27	0,55	1,00

#### **4.5.2. Análises das direções principais do processo: PCA**

A análise das direções principais ou autovalores do sistema é de grande importância para investigar se as flutuações experimentais são, de fato, induzidas por uma fonte comum de erros e para determinar quantos fatores, ou seja, direções características concentram as flutuações do sistema. A análise foi realizada com o software StatSoft STATISTICA v8.0 e pode nos dar informações sobre a cinética local

do processo. De acordo com o procedimento padrão de PCA, os autovalores e autovetores das matrizes de covariância dos componentes das reações metabólicas foram computados para cada experimento de fermentação realizado e ordenados em ordem decrescente de magnitude. Os dados obtidos são apresentados nas Tabelas 14 e 15 e os valores em negrito são considerados significativos dentro dos níveis de confiança de 95%.

Tabela 14. Análise das direções principais para as condições de fermentação F01 e F02, considerando todas as medidas disponíveis.

	Condições					
	F01 (T=23°C e °Br=15)			F02 (T=23°C e °Br=10)		
	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 1	Fator 2	Fator 3
<b>Et</b>	<b>-0,957</b>	0,144	0,074	<b>-0,827</b>	0,197	-0,468
<b>2m1b</b>	<b>-0,949</b>	0,183	-0,090	<b>-0,941</b>	-0,198	-0,082
<b>Acet</b>	<b>-0,778</b>	-0,557	-0,173	-0,108	<b>-0,899</b>	0,086
<b>Trip</b>	0,386	0,163	<b>-0,896</b>	-0,294	0,699	0,502
<b>FEA</b>	<b>-0,761</b>	0,249	-0,259	-0,365	-0,235	<b>0,842</b>
<b>AI</b>	0,005	<b>0,974</b>	0,123	-	-	-
<b>Variância cumulativa (%)</b>	91,380			88,510		

Tabela 15. Análise das direções principais para as condições de fermentação F03 a F05, considerando todas as medidas disponíveis.

	Condições					
	F03 (T=19°C e °Br=12,5)		F04 (T=15°C e °Br=15)		F05 (T=15°C e °Br=10)	
	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2	Fator 1	Fator 2
<b>Et</b>	<b>-0,912</b>	0,004	<b>0,972</b>	0,121	<b>-0,798</b>	-0,646
<b>2m1b</b>	<b>-0,975</b>	0,047	<b>0,972</b>	-0,043	<b>-0,930</b>	-0,013
<b>Acet</b>	<b>-0,794</b>	0,468	0,491	<b>-0,711</b>	-0,449	<b>0,801</b>
<b>Trip</b>	<b>-0,817</b>	-0,004	<b>0,864</b>	-0,084	<b>-0,847</b>	0,286
<b>FEA</b>	<b>-0,898</b>	0,000	<b>0,941</b>	-0,040	<b>-0,869</b>	-0,159
<b>AI</b>	-0,497	<b>0,842</b>	0,524	<b>-0,732</b>	-	-
<b>Variância cumulativa (%)</b>	84,400		85,080		83,830	

A primeira informação obtida da análise é que um pequeno número de fatores é responsável pela maioria das variações experimentais observadas. Para as duas

primeiras condições, F01 e F02, com o ponto máximo de temperatura, apenas 3 fatores concentram mais de 91,38 e 88,51%, respectivamente, da variância total experimental. Para os ensaios de temperaturas inferiores, de F03 a F05, somente dois fatores são suficientes para acumular 84,4, 85,08, 83,83% da variância total.

Além disso, os autovetores mostram que as componentes individuais não variam muito no espaço amostral, mas sim ao longo das direções principais. Pode-se notar, em geral, que a primeira direção de flutuação estabelece uma clara ligação entre o etanol e os álcoois superiores. Como especificado anteriormente, isso parece fazer muito sentido, já que esses álcoois seguem a rota metabólica de Ehrlich para serem produzidos, ou uma rota paralela, como no caso do etanol. Já a segunda direção de flutuação parece representar um metabolismo que não envolve a formação dos álcoois, que pode ser tanto relacionado à formação do acetato de isopentila e demais ésteres ou à conversão do piruvato em acetaldeído, que forma o etanol. Isso pode explicar o fato de na condição F03 todos os álcoois e acetaldeído estarem interligados, visto que esta é uma condição mais equilibrada, em que as variáveis são mais similares.

Outra observação que pode ser realizada é que os valores dos álcoois e do éster apresentam sinais opostos e isso pode ser um indício de que um é consumido para o outro ser formado, já que os ésteres são formados também a partir de seus respectivos álcoois superiores. O triptofol na primeira condição se encontra no terceiro fator, o que pode ser uma indicação de que, a uma elevada temperatura e um alto °Br, o metabolismo do triptofol difere do metabolismo dos demais álcoois, algo que pode ser justificado pelas mudanças na rota de formação deste álcool, citadas previamente.

Torna-se claro com a análise de PCA, que a variação nos erros amostrais nos informa sobre de que forma os metabólitos estão associados, tornando válida a análise para interpretação dos mecanismos de reação.

#### **4.5.3. Modelagem empírica das variáveis do processo**

O planejamento experimental proposto possibilitou a modelagem estatística dos dados através do software StatSoft STATISTICA v8.0. Para isso, as variáveis foram normalizadas no intervalo [-1 a 1], para que os seus efeitos pudessem ser comparados

sem dimensão. Todos os efeitos e sinergias das variáveis do processo foram utilizados para a modelagem. Sempre que algum parâmetro associado ao efeito não era significativo, o efeito foi descartado do modelo. Como o planejamento era fatorial a dois níveis, com apenas duas variáveis independentes, efeitos não lineares de concavidade não chegaram a ser introduzidos no modelo.

Os modelos mostrados a seguir também tem por função, tornar possível o controle e a otimização da formação desses metabólitos (variáveis de saída) no produto final, dependendo da cerveja que se deseja obter. Assim, a modelagem foi realizada levando em conta apenas o ponto final de fermentação, bem como as 10 réplicas realizadas para cada condição experimental. Nesse caso, os valores finais obtidos foram relativamente próximos aos que caracterizaram o perfil aromático da cerveja produzida, levando em conta a etapa de maturação, que modificou um pouco o perfil de concentração obtido no fim do processo fermentativo.

O modelo empírico proposto para representar a concentração de cada metabólito em função da T e do °Br inicial, na faixa experimental estudada foi:

$$\text{Metabólito} \left( \frac{mg}{L} \right) = a_0 + a_1 * T + a_2 * Br0 + a_3 * T * Br0 \quad (12)$$

Onde  $a_i$ ,  $i=0,1,2$  e  $3$ , são os parâmetros estimados para cada efeito principal e sinergia, temperatura é o valor de temperatura, e Br0 é o valor de °Brix inicial do processo. O primeiro modelo proposto foi o do etanol. Os parâmetros obtidos através do software foram substituídos na equação 12, gerando o modelo empírico para esta variável, apresentado abaixo:

$$\text{Etanol} \left( \frac{mg}{L} \right) = (2652,39 \pm 378,62) + (1271,60 \pm 423,31) * T + (12260,35 \pm 423,31) * Br0 - (1587,01 \pm 423,31) * T * Br0 \quad (13)$$

O modelo para a concentração de etanol no fim da fermentação é significativamente influenciado por ambas as variáveis e pelo seu efeito de interação, indicando a existência de sinergias e não linearidades. Tanto a temperatura como o °Br inicial interferem positivamente para o aumento de concentração desse metabólito; ou seja, quando o °Br e a T aumentam, a concentração de etanol no mosto também aumenta. Porém, o efeito de interação entre essas variáveis apresentam um efeito negativo sobre a quantidade de etanol formada, mostrando que há efeito de saturação ou limitação nas máximas taxas de fermentação.

Pode-se concluir também que o °Br inicial é a variável que mais afeta a formação desse composto, confirmando a hipótese que já havia sido discutida nas análises do perfil de concentração. Como explicado, o °Br inicial representa o teor de carbono disponível para a levedura manter seu metabolismo regulado, para crescimento e reprodução pelo processo de fermentação, consumindo o açúcar e convertendo-o em etanol e nos demais metabólitos secundários. Assim, quanto mais açúcar, mais etanol é produzido ao longo do processo. A temperatura, apesar de influenciar em uma menor proporção, também impulsiona a produção desse metabólito. Isso ocorre porque o aumento de temperatura impulsiona o transporte de aminoácidos para a célula, viabilizando as rotas de produção desse álcool, como já citado.

O modelo pode ser considerado satisfatório, levando em conta o valor do coeficiente de correlação entre os valores experimentais e os valores preditos,  $R^2$ , que foi de 0,949. O gráfico ilustra o desempenho do modelo na Figura 40, por meio da dispersão dos pontos no eixo horizontal, obtidos pela comparação entre os valores observados experimentalmente e os obtidos pelo modelo.



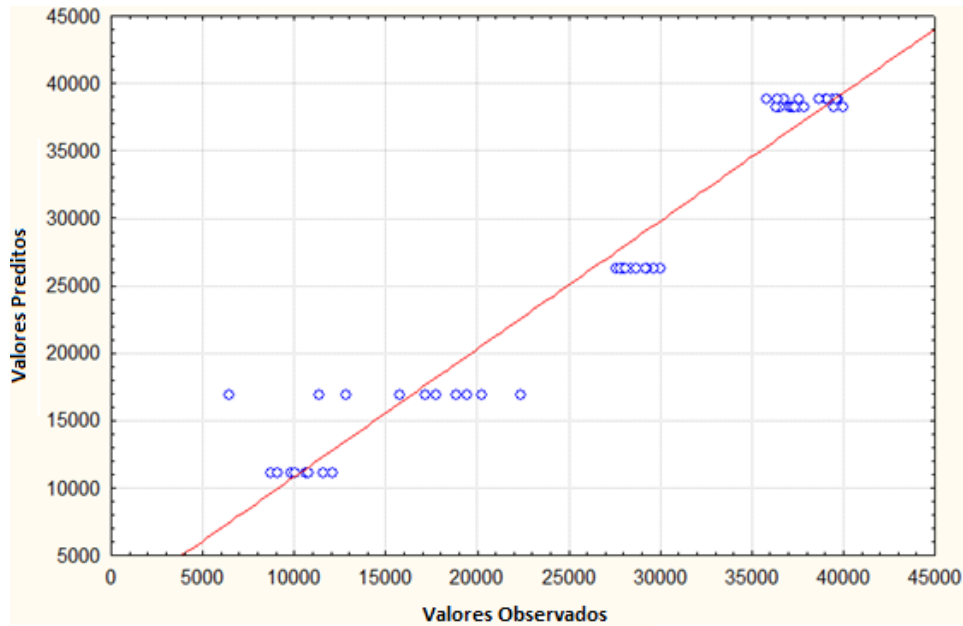


Figura 40. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para a concentração de etanol.

É importante que os pontos estejam pouco dispersos em relação ao modelo (linha vermelha), o que é observado no geral, indicando que o modelo apresenta um bom ajuste. A verificação da hipótese de normalidade também pode ser realizada com auxílio das curvas dos resíduos do modelo, como mostrado na Figura 41. Nessa figura vê-se como se comporta o modelo proposto quanto à distribuição dos resíduos em relação ao comportamento normal. Analisando o gráfico obtido, pode-se concluir que os erros são bem distribuídos, com poucos desvios em relação à curva de distribuição normal, com a provável presença de um outlier.

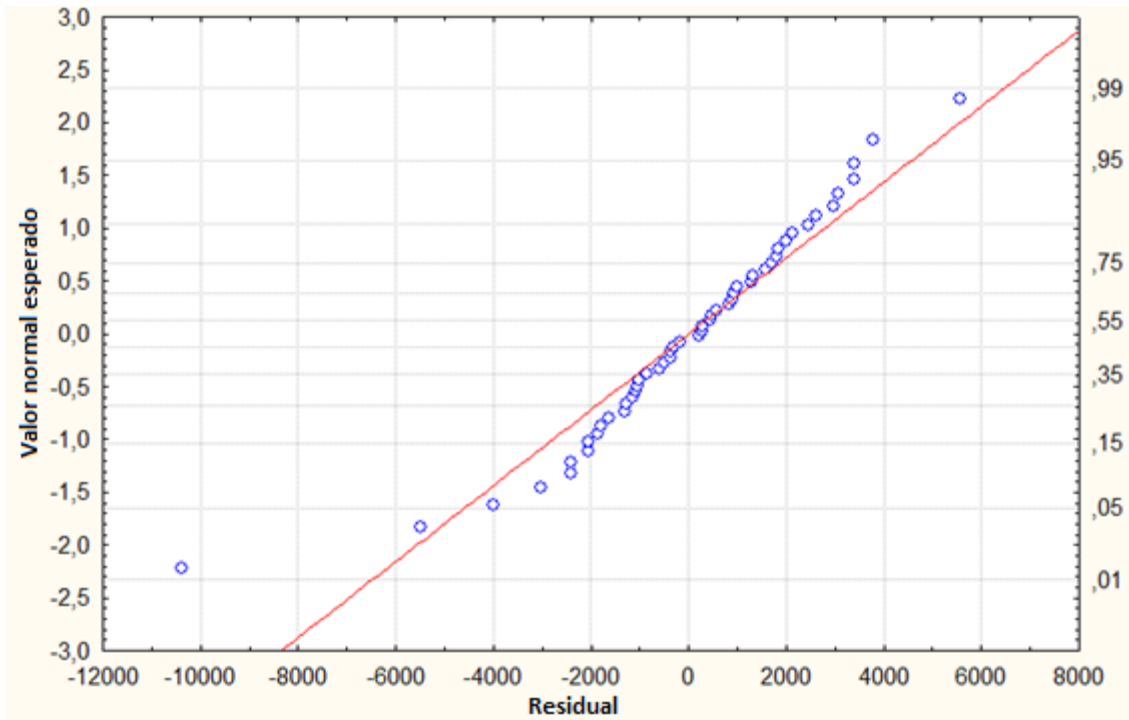


Figura 41. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o etanol.

O mesmo processo de modelagem empírica foi repetido para as demais variáveis medidas do sistema. O modelo obtido para o 2-metil-1-butanol é mostrado na Equação (14):

$$2m1b \left( \frac{mg}{L} \right) = (17,35 \pm 0,33) + (1,14 \pm 0,37) * T + (10,6 \pm 0,37) * Br0 + (1,73 \pm 0,37) * Br0 * T \quad (14)$$

Pode-se ver que ambas as variáveis separadamente, bem com o respectivo efeito de interação, afetam a produção de 2m1b e de forma positiva. Além disso, o °Br continua exercendo um maior efeito sobre a concentração do metabólito no fim da fermentação, em relação à temperatura. Um aumento na temperatura também viabiliza a rota metabólica de Ehrlich, por meio da qual os álcoois são formados. Porém, pode-se inferir que, como o açúcar é a base de todo o processo fermentativo, a quantidade de açúcar no início do processo exerce maior importância para favorecer a formação dos compostos. O modelo apresentou um  $R^2$  de 0,948 e a análise dos valores calculado pelo

modelo em função dos valores observados experimentalmente pode ser visto no gráfico ilustrado na Figura 42.

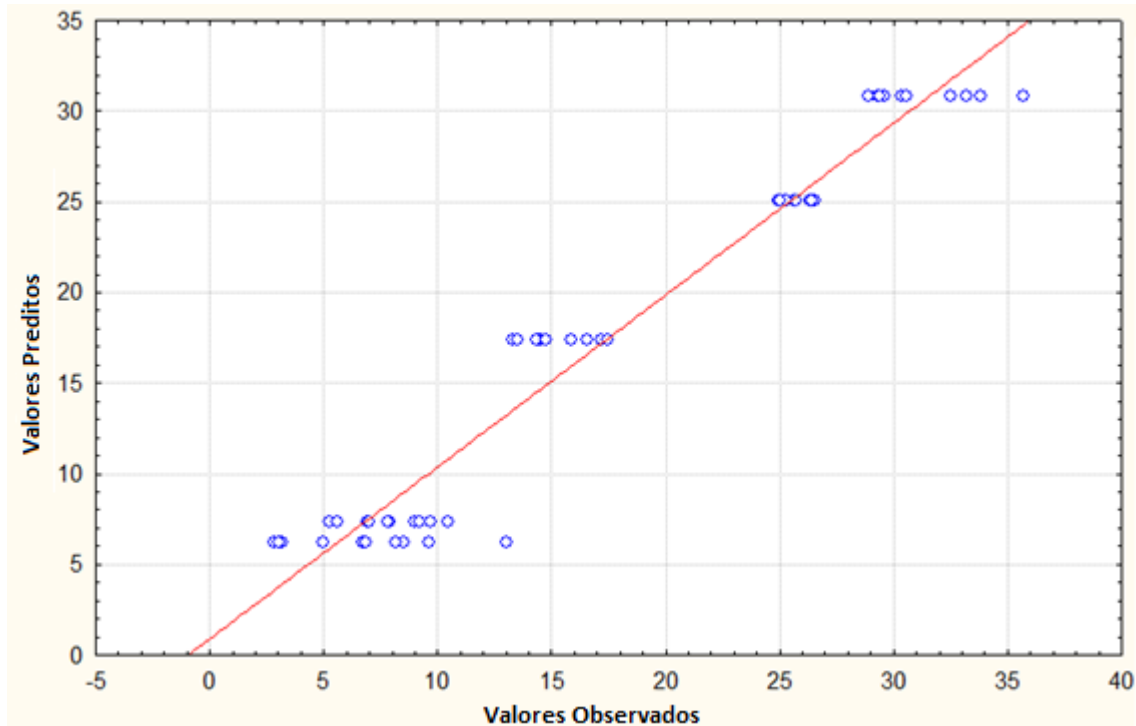


Figura 42. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o 2m1b.

O gráfico mostra o quão bem os dados estão ajustados ao modelo, já que não há muita dispersão dos pontos, o que torna o modelo bastante satisfatório. Uma análise de como o resíduo se encaixa na distribuição normal também foi realizada e é apresentada na Figura 43. Novamente, conclui-se que os erros são bem distribuídos, com poucos pontos fora da curva de distribuição, o que reforça o bom desempenho do modelo proposto.

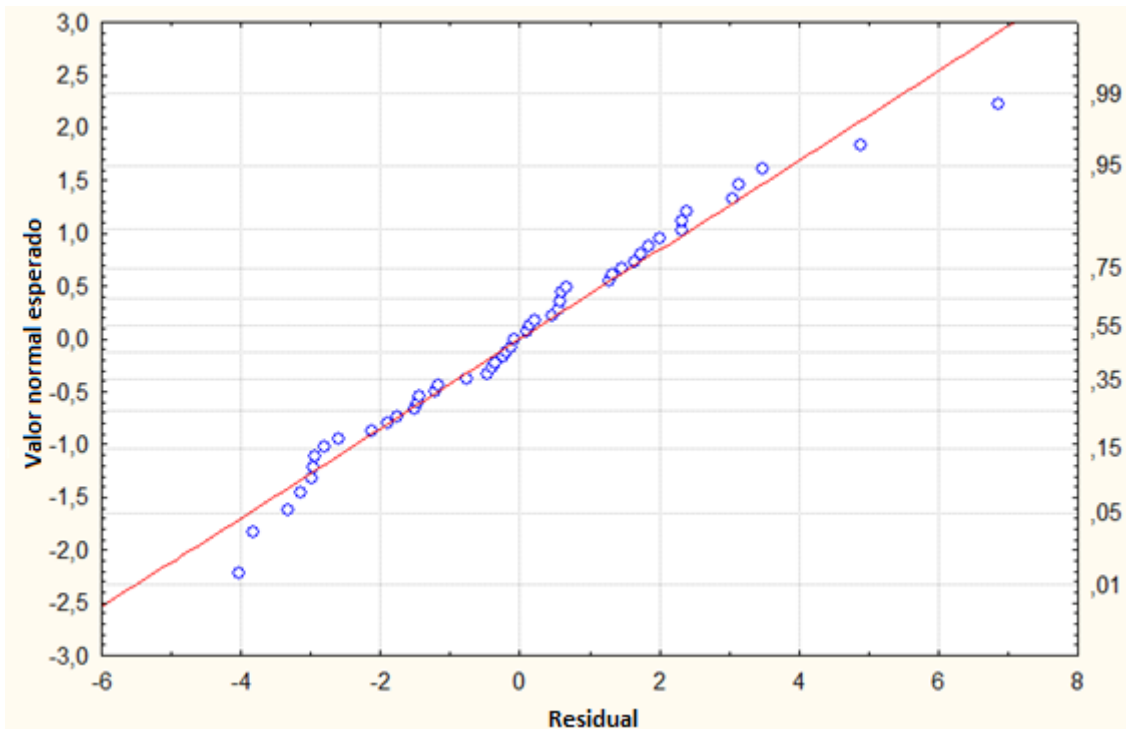


Figura 43. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o 2mlb.

Para o acetaldeído, o modelo estatístico obtido foi:

$$Acet \left( \frac{mg}{L} \right) = (12,38 \pm 0,40) + (2,31 \pm 0,44) * T + (5,83 \pm 0,44) * Br0 + (2,77 \pm 0,44) * T * Br0 \quad (15)$$

O modelo obtido, mais uma vez, mostra que tanto a temperatura quanto o °Br interferem positivamente para o nível alcançado pela substância ao fim da fermentação e que a intensidade com que o °Br inicial é uma vez mais intensa. Entretanto, o efeito de sinergia entre o °Br e a temperatura é mais influente na formação do acetaldeído do que o efeito principal de temperatura. Esse fato também foi observado na análise do perfil de concentração do composto, sendo mais complexo de ser compreendido. O acetaldeído é um intermediário para a formação do etanol, e dependendo da temperatura em que ocorre a fermentação, ele pode voltar a ser produzido. Caso o etanol seja consumido por falta de açúcares fermentescíveis. Isso pode explicar a influência da interação desses fatores sobre a variável medida.

Como a modelagem foi realizada apenas para o último ponto da fermentação e a formação de acetaldeído variou um pouco com o etanol, voltando a ser consumido em alguns ensaios, o modelo obtido não foi tão satisfatório quanto os anteriores, com um  $R^2$  no valor de 0,839. No gráfico da Figura 44, nota-se que o modelo até se ajusta aos dados, embora haja um grau maior de dispersão dos pontos.

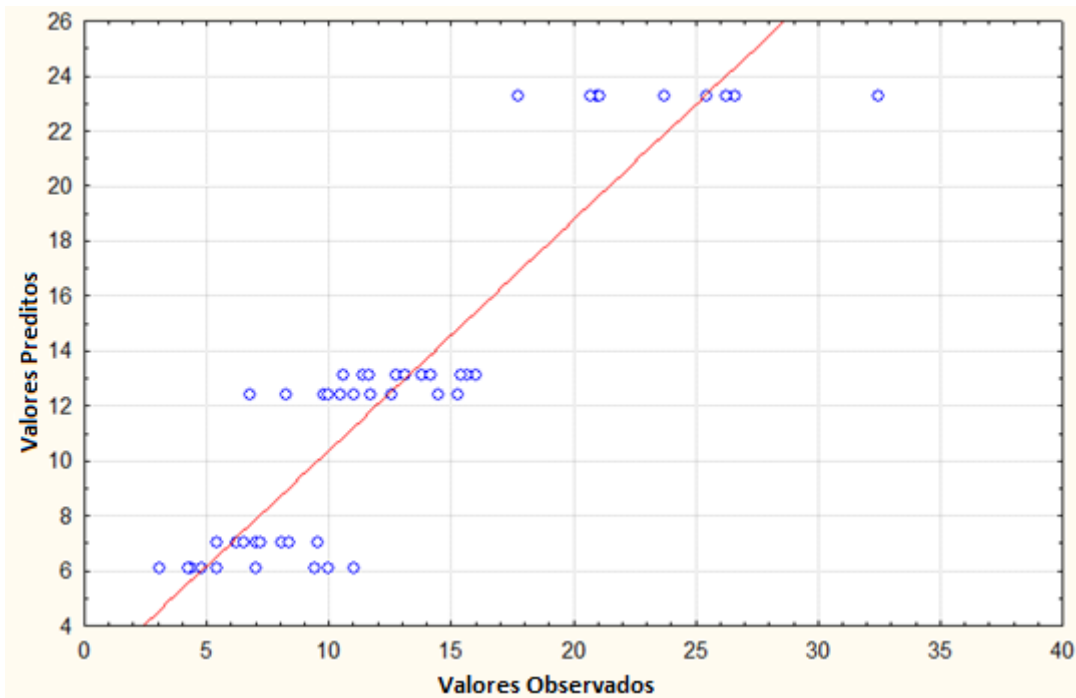


Figura 44. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o acetaldeído.

O gráfico ilustrado na Figura 45 foi analisado com o intuito de inferir sobre a distribuição normal dos erros paramétricos. Da mesma forma que nos casos anteriores, pode-se concluir que os erros seguem uma distribuição normal, com alguns poucos pontos fora da linha de distribuição e a ocorrência de um provável outlier.

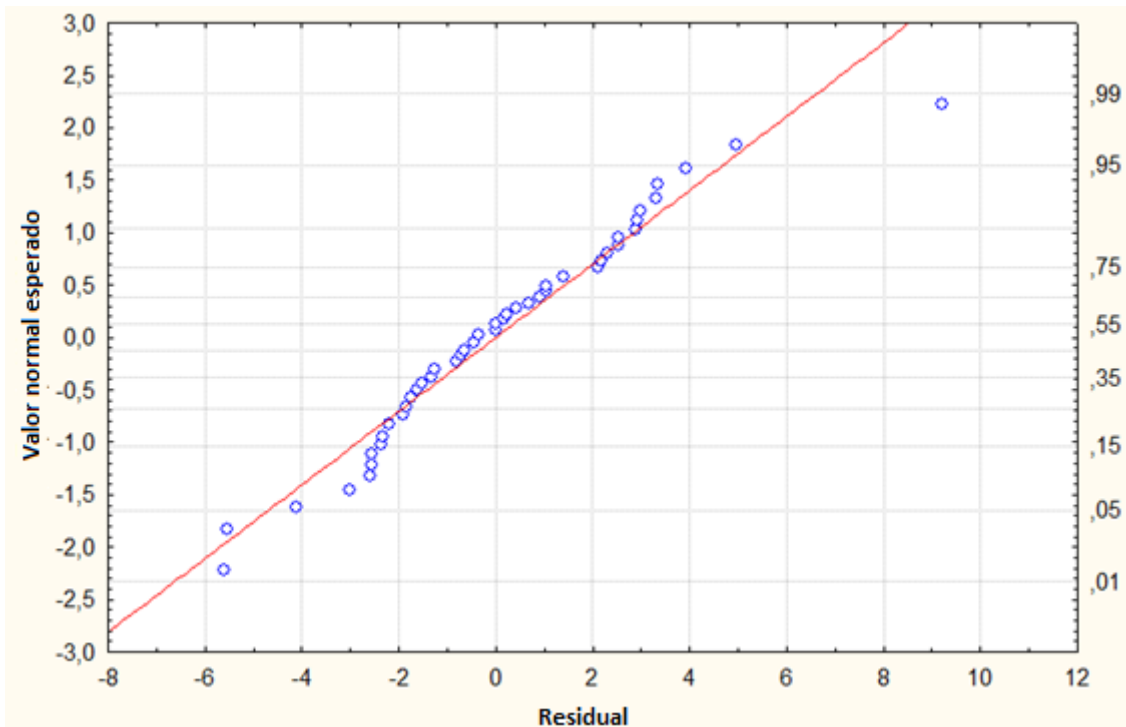


Figura 45. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o acetaldeído.

O modelo obtido para o triptofol pode ser observado abaixo:

$$\text{Triptofol} \left( \frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = 4,35 \pm 0,20 + (0,586 \pm 0,22) * T \quad (16)$$

Diferentemente do que foi observado nos modelos anteriores, o modelo empírico para essa variável só resultou em dois parâmetros significativos. Tanto o °Br quanto a interação entre essa variável independente e a temperatura mostraram influência pouco significativa sobre a formação desse metabólito ao fim da fermentação. Entretanto, sabe-se que a formação de todos os metabólitos voláteis depende da quantidade de açúcares no meio, mesmo que pouco, e isso não foi observado pelo modelo. Esse fato pode ter ocorrido devido ao mecanismo metabólico mais complexo do triptofol, que variou muito ao longo da fermentação, não podendo ser explicado apenas pelo seu ponto final, utilizado para fins de modelagem. O estudo do perfil de concentração já tinha previsto que a temperatura influenciava a formação do composto de forma negativa; ou seja, quanto menor era a temperatura, maior era a concentração final de

triptofol e que esta influenciava mais a produção do metabólito do que o °Br, o que foi de fato confirmado pelo modelo.

O modelo linear obtido não explicou o comportamento para a evolução dinâmica do triptofol e isto pode ser confirmado com o valor do coeficiente de correlação entre os valores experimentais e os valores preditos,  $R^2$ , que foi de 0,130. O gráfico ilustrado na Figura 46 mostra que não houve ajuste dos dados ao modelo, visto que os pontos estão bastante dispersos no gráfico. Esse comportamento, como mostra o gráfico pode ser devido à larga variação das medidas em relação à variação total do triptofol na região experimental, tornando o modelo pouco sensível aos efeitos das variáveis.

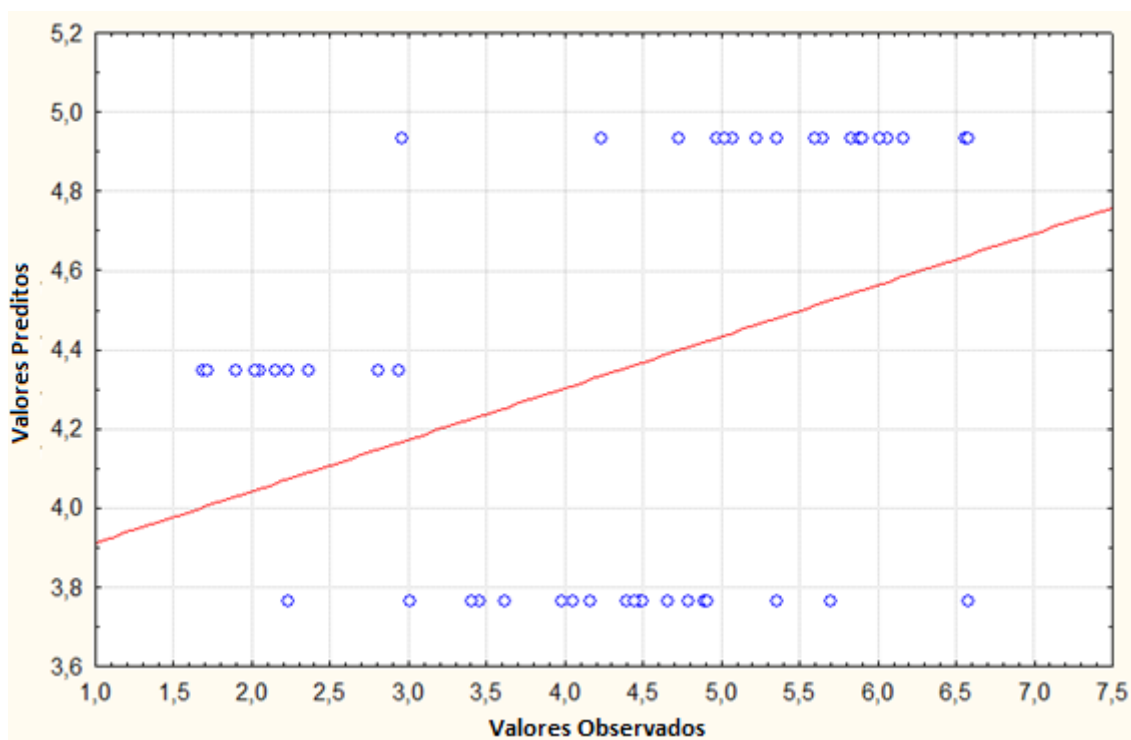


Figura 46. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o triptofol.

Apesar do modelo não ser satisfatório, os erros de predição mostram seguir uma distribuição normal, porém de forma mais dispersa que as observadas para os compostos voláteis anteriores. Esse resultado reforça a interpretação de que os erros experimentais podem controlar as flutuações de triptofol no plano experimental.

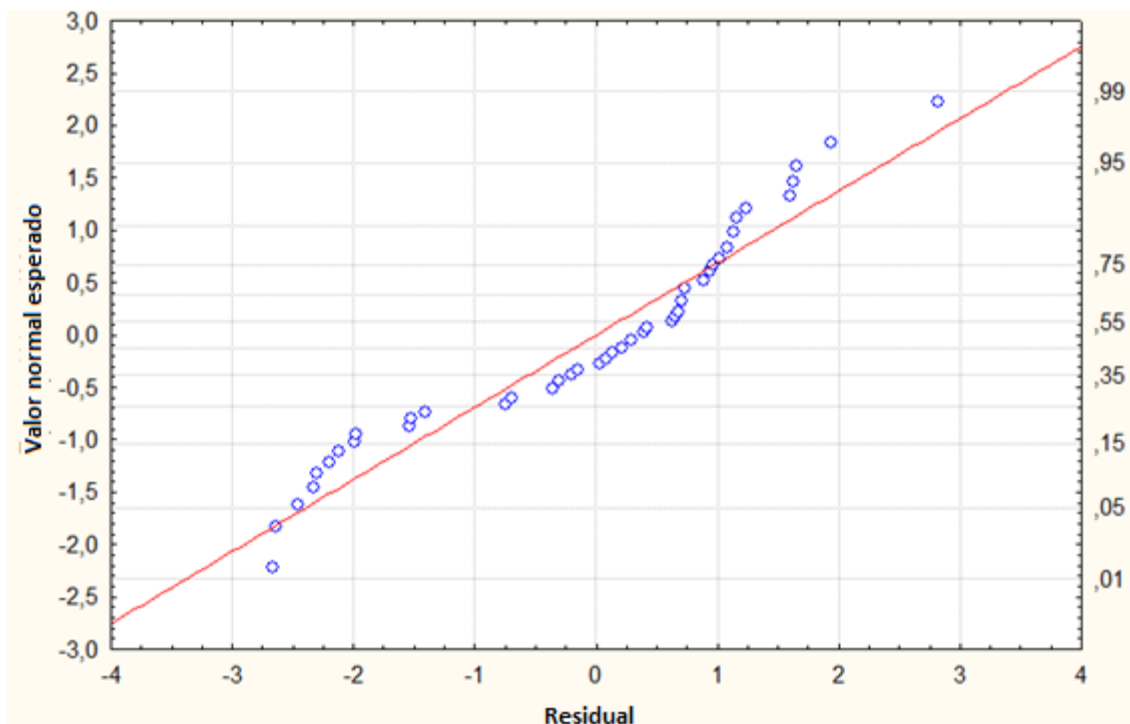


Figura 47. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o triptofol.

O último álcool superior a ser modelado foi o álcool fenético (FEA) e o modelo estatístico computado para esse composto é mostrado na Equação (17):

$$FEA \left( \frac{mg}{L} \right) = (34,24 \pm 0,47) + (7,87 \pm 0,53) * T + (8,06 \pm 0,53) * Br0 - (2,67 \pm 0,53) * T * Br0 \quad (17)$$

Considerando o modelo para esse álcool, pode-se observar que todas as variáveis influenciam de forma significativa a concentração final de FEA. Neste caso, há um maior equilíbrio entre os efeitos individuais do °Br inicial e da T. Levando-se em conta o erro, os parâmetros associados a essas variáveis são praticamente iguais. Mostrando que ambas as variáveis impactam, de forma similar e positivamente a concentração final do composto no fim da fermentação. A explicação para esse ocorrido é a mesma que para os álcoois anteriormente apresentada. Um aumento na temperatura viabiliza a rota de Ehrlich e um °Br inicial é responsável por um maior teor de carbono disponível para a levedura realizar o mecanismo metabólico. O fato de o álcool fenético ter um



mecanismo de formação mais simplificado, por meio de substâncias mais disponíveis, também pode dar suporte à justificativa apresentada. Já a interação entre as variáveis de entrada mostrou afetar negativamente a concentração de FEA obtida, algo que também foi observado para o etanol. Essa semelhança pode estar no fato de que depois do etanol, o álcool fenético é comumente o álcool mais abundante no mosto durante a fermentação. Esse comportamento pode ser devido a uma saturação do processo de fermentação ou à ocorrência de inibição induzida pelo excesso de açúcares no início da fermentação.

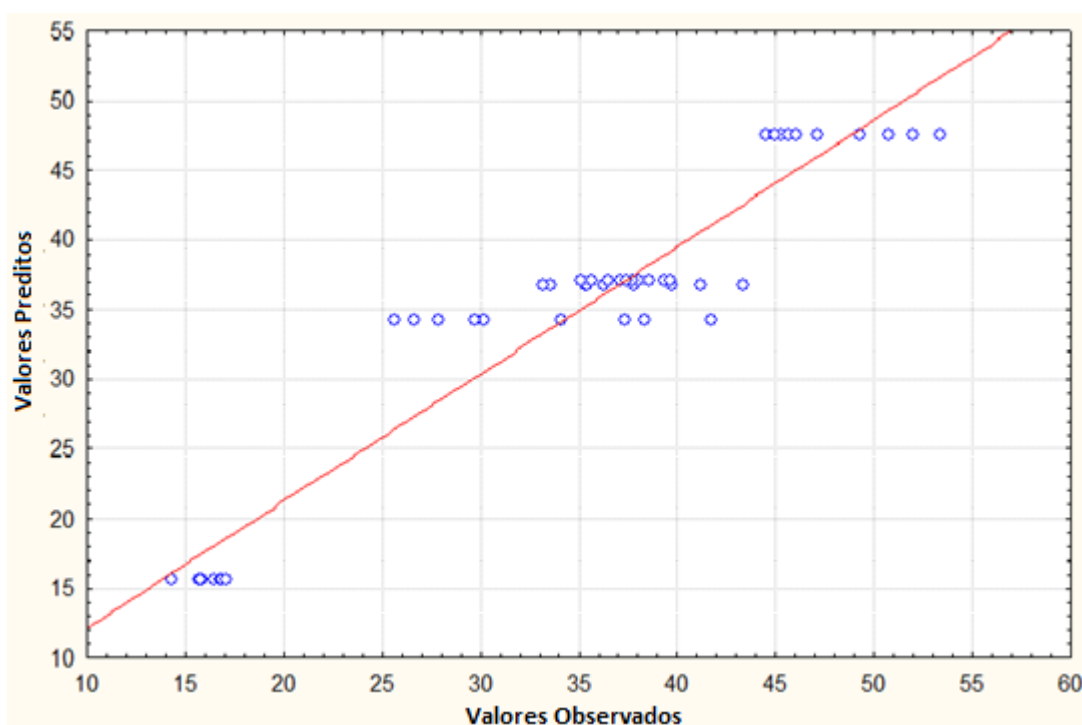


Figura 48. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o álcool fenético.

Analisando a Figura 48, que mostra o gráfico para os valores observados em função dos preditos, pode-se concluir que o modelo se ajusta aos dados. O  $R^2$  foi igual a 0,912, o que confirma que o modelo é satisfatório. O gráfico da Figura 49 mostra que o resíduo se encaixa na distribuição normal.

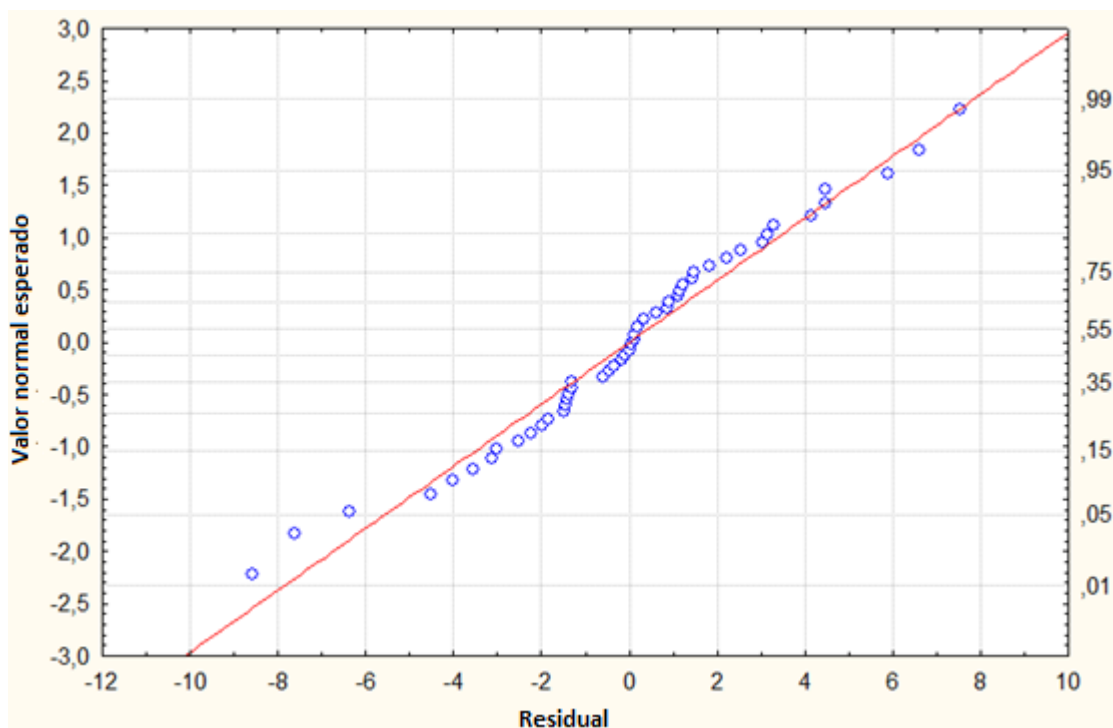


Figura 49. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o álcool fenetílico.

Por fim, o modelo empírico elaborado para o éster analisado, o acetato de isopentila, é apresentado na Equação (18):

$$AI \left( \frac{mg}{L} \right) = (0,22 \pm 0,017) + (0,076 \pm 0,0019) * T + (0,24 \pm 0,019) * Br0 + (0,076 \pm 0,019) * T * Br0 \quad (18)$$

Por meio do modelo foi possível notar que todas as variáveis exercem influência positiva sobre a concentração de acetato de Isopentila no fim do processo fermentativo. Isso havia sido observado e explicado na análise do perfil de concentração do metabólito. Quanto maior é o °Br inicial, maior é a formação do éster, pois o alto teor de carbono regulariza o metabolismo celular e aumenta a produção da enzima utilizada para a geração desses compostos. Já a temperatura viabiliza a produção dos álcoois superiores e etanol, substâncias pelas quais os ésteres são produzidos.

O modelo, porém, não é muito satisfatório quando se analisa o gráfico obtido pela comparação entre os valores observados experimentalmente e os obtidos pelo modelo. No gráfico da Figura 50, pode-se notar que os pontos, em geral, estão bastante dispersos, não havendo um bom ajuste do modelo aos dados experimentais.

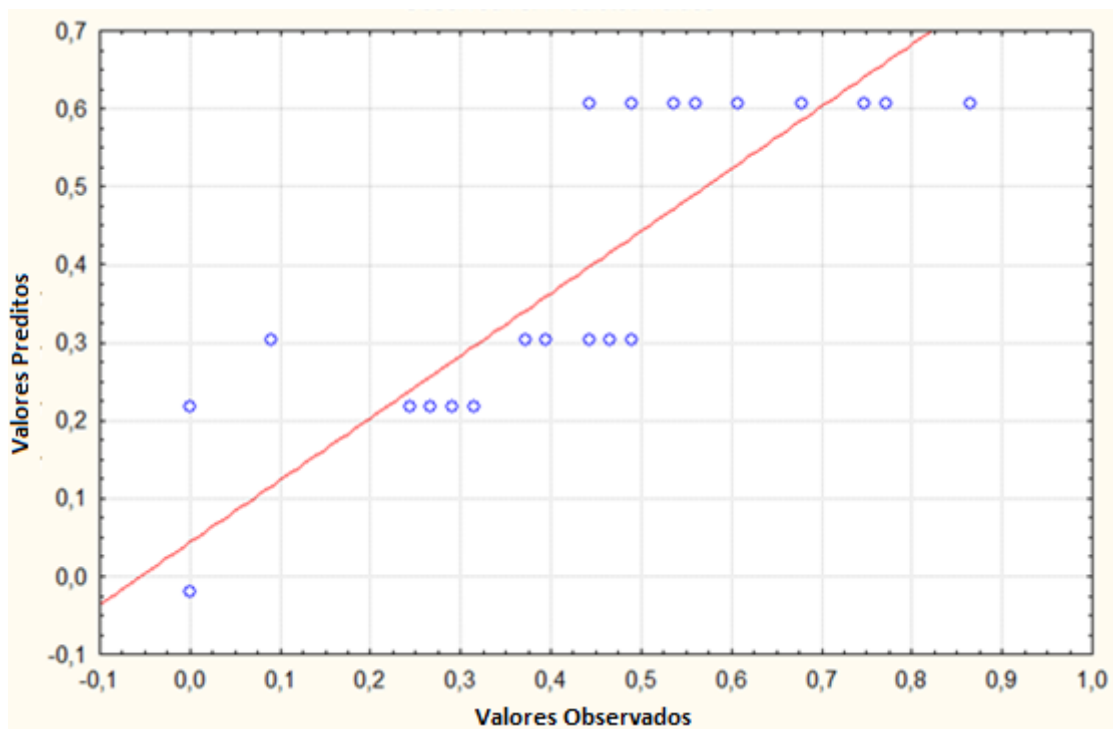


Figura 50. Valores preditos pelo modelo em função dos valores observados experimentalmente para o acetato de isopentila.

O valor de  $R^2$ , 0,800, está um pouco abaixo dos valores obtidos para os demais modelos, com exceção do modelo para o triptofol, e representa também certa falta de ajuste aos dados experimentais. Os erros de predição também se mostram um pouco mais dispersos do que nos casos anteriores quanto á curva de distribuição normal, Figura 51, embora possam ser considerados como distribuídos normalmente.

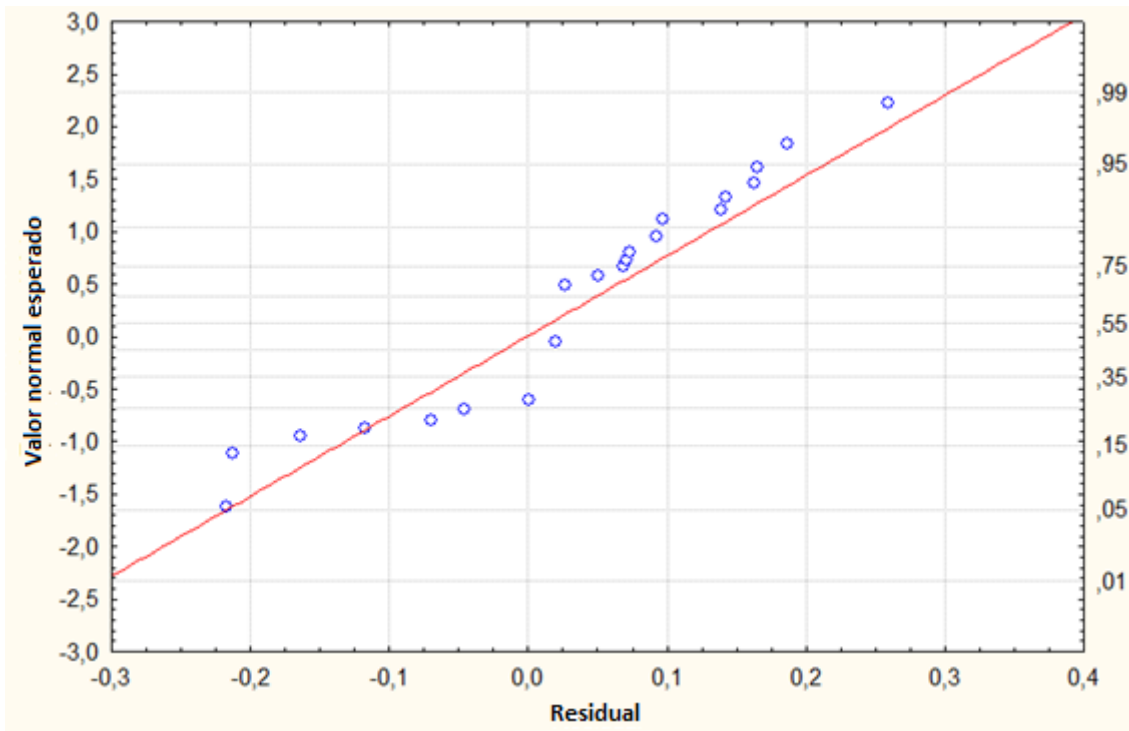


Figura 51. Distribuição dos resíduos quanto à distribuição normal para o acetato de isopentila.

## 5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho uma levedura isolada da casca da jabuticaba foi investigada, a fim de avaliar seu uso potencial na produção de cerveja artesanal. A levedura fermentou bem o mosto cervejeiro de maneira rápida e mostrou um bom desempenho na faixa de temperaturas estudada. O microrganismo apresentou um melhor crescimento a uma temperatura mais elevada e foi classificada como uma levedura do tipo Ale. A levedura mostrou ainda ser resistente às perturbações do meio, apresentando 100% de viabilidade durante todo o processo fermentativo e em todas as condições experimentais estudadas.

Os principais metabólitos voláteis identificados pelo GCMS foram o etanol, o 2-metil-1-butanol, o acetaldeído, o triptofol, o álcool fenetílico e o acetato de isopentila. Um planejamento fatorial foi realizado e permitiu a análise experimental da influência da temperatura e do °Br inicial sob a formação de cada um desses metabólitos. O estudo permitiu que uma análise do perfil de concentração fosse realizada, bem como uma análise estatística fosse desenvolvida.

As análises dos perfis de concentração mostraram que para todos os compostos analisados, com exceção do triptofol, o °Br inicial é variável mais influente que a temperatura. Quanto maior é o °Br inicial, maior são as concentrações dos metabólitos ao fim da fermentação. A temperatura também mostrou influenciar positivamente a produção desses metabólitos, porém em níveis menores que o °Br. Para o triptofol, notou-se que a temperatura influencia mais a variação de concentração, porém negativamente. Quanto maior é a temperatura, menor o nível de triptofol no meio fermentativo. Contudo, a análise dos efeitos para o triptofol está muito prejudicada pelo nível de flutuações experimental.

O teste t e o teste F, que iniciaram as análises estatísticas, mostraram como as médias e variâncias amostrais variam com o tempo e com as condições experimentais realizadas, podendo conter informações sobre a cinética da fermentação. Uma correlação muito forte entre o etanol e o 2m1b também foi observada nesses testes. Essa correlação foi em seguida confirmada com o estudo das matrizes de correlação dos dados.

Para inferir sobre a cinética local do sistema, uma análise das direções principais do processo foi realizada. Essa análise concluiu que um pequeno número de fatores é responsável pela maioria das variações do sistema. O primeiro fator mostra a ligação metabólica entre o etanol e os álcoois superiores. O segundo e terceiro fatores, descrevem os mecanismos metabólicos que ocorrem em momentos diferentes, não paralelos à formação dos álcoois. A diferenciação do éster como produto da reação dos álcoois também pode ser observada, por conta dos sinais opostos dos coeficientes na composição das direções principais.

Por fim, para observar de forma mais clara as tendências do processo, viabilizando também o controle e possível otimização das variáveis, uma modelagem estatística foi realizada. Cada metabólito volátil medido foi modelado e tudo que havia sido observado na análise dos perfis de concentração foi confirmado numericamente pelos modelos obtidos. Em geral, a modelagem empírica foi satisfatória. Para as concentrações de acetaldeído e álcool fenetílico, os modelos foram razoáveis, mas dão uma boa idéia das tendências de formação desses compostos. Já para o triptofol, o modelo linear elaborado não explicou o comportamento para evolução dinâmica de sua concentração, em função dos erros de medição, como explicado.

Diante das dificuldades de se estudar sistemas biológicos, devido sua complexidade, algumas sugestões para trabalhos futuros são apresentadas:

- Analisar outras cepas de leveduras isoladas da natureza para produção de cervejas artesanais e verificar se o que foi estudado neste trabalho pode ser aplicado a outros microrganismos;
- Em relação à levedura da jabuticaba utilizada neste trabalho, um estudo mais detalhado da viabilidade celular pode ser realizado. Fermentações em série podem ser realizadas, utilizando as leveduras ressuspensas de um ensaio como inóculo do ensaio a seguir, avaliando até que ponto a viabilidade da levedura é alta o suficiente para não afetar a qualidade final da cerveja;
- Um estudo dos açúcares não fermentescíveis, muito complexos para serem quebrados pela levedura e utilizados no processo de fermentação. Esse estudo pode também ser realizado com a finalidade de entender o limite de densidade final atingido pela levedura ao fim da fermentação;

- Estudar melhores condições para a etapa de maturação, a fim de evitar a oxidação do etanol em acetaldeído;
- Fazer um planejamento experimental mais completo para melhorar os modelos obtidos referentes aos metabólitos analisados, já que modelos lineares podem não representar tão bem a trajetória dinâmica dos dados. Em particular, propõe-se o uso de modelos fenomenológicos para todo o curso de reação.
- Avaliar como outras variáveis, como pH e inóculo, podem afetar a formação desses metabólitos, bem como a qualidade de cerveja final obtida.

O mercado de cervejas artesanais tem crescido muito no Brasil e pesquisas nessa área são de fundamental importância para impulsionar avanços tecnológicos, colocando o Brasil como um forte corrente na produção de cervejas de qualidade, a partir de produtos provenientes da própria microbiota brasileira.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRABE. Associação Brasileira de Bebidas – ABRABE, 2014. Disponível em: <<http://www.abrabe.org.br/categorias/ASBC>>. Acesso em: 06.02,2017.

ABRAHÃO-NETO, José; INFANTI, Patrícia; VITOLO, Michele. “Hexokinase production from *S. cerevisiae*”. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 57, n. 1, p. 407-412, 1996.

ABSC. American Society of Brewing Chemists, 2015. Disponível em: <[http://methods.asbcnet.org/Flavors\\_Database.aspx](http://methods.asbcnet.org/Flavors_Database.aspx)>. Acesso em: 15.01.2017.

ALVES, D. M. G. **Fatores que afetam a produção de ácidos orgânicos bem como outros parâmetros da fermentação alcoólica**. D.Sc. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba. São Paulo. 128f. 1994.

AMORIM, HV de; LEÃO, Regina Machado. **Fermentação alcoólica: ciência e tecnologia**. Piracicaba: Fermentec, 2005.

AQUARONE, Eugênio. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação**. Edgard Blucher, 1983.

BAMFORTH, C. W.; KANAUCHI, M. “Enzymology of vicinal diketone reduction in brewer's yeast”. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, n. 2, p. 83-93, 2004.

BARROS NETO, Benício; SCARMINIO, Ieda Spacino; BRUNS, Roy Edward. **Como Fazer Experimentos-: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. Bookman Editora, 2010.

BARTH, Roger. **The chemistry of beer**. In: Using Food To Stimulate Interest in the Chemistry Classroom. American Chemical Society, 2013. p. 37-47.



BARTLE, Keith D.; MYERS, Peter. "History of gas chromatography". **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 9, p. 547-557, 2002.

BELLOCH, Carmela et al. "Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex". **International journal of food microbiology**, v. 122, n. 1, p. 188-195, 2008.

BENTO, Camila Vieira; DE ALMEIDA, João Batista. "Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte—as leveduras". **Revista Analytica**, n.25, p.36-42, 2006.

BOKULICH, Nicholas A.; BAMFORTH, Charles W. "The microbiology of malting and brewing". **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 05 de setembro de 1997. P. 19549.

BRASIL, Jorge L. et al. "Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu (II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente". **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 548-553, 2007.

BREITKREITZ, Márcia Cristina et al. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. Um tutorial, parte III. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p. 564-573, 2014.

BRIGGS, Dennis E. et al. **Brewing: science and practice**. Elsevier, 2004.

BREWERS FRIENDS. Brewers friends website. [<www.brewersfriend.com/refractometer-calculator/>](http://www.brewersfriend.com/refractometer-calculator/). Acesso em 12.06.2017.

CANTWELL, Frederick F.; LOSIER, Manon. "Liquid—liquid extraction". **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 37, p. 297-340, 2002.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da cerveja – CERVBRASIL. Disponível em: <<http://www.cervbrasil.org.br/paginas/index.php?page=mercado-ervejeiro>>. Acesso em: 26.03.2017

CHARANEK, Kalil Lelis. **Influência de variáveis de processo na produção de metabólitos voláteis em fermentação de cerveja artesanal**. Dissertação M.Sc. PEQ/COPPE – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 113 p., 2016.

CHIARADIA, Mariza C. et al. “O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos”. **Química nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHRISTENSEN, Ronald. **Analysis of variance, design, and regression: applied statistical methods**. CRC Press, 1996.

CHROMATOGRAPHY ONLINE. Chromatography online website. Disponível em: <[www.chromatography-online.org/Detectors/Flame-Ionization/rs\\_2\\_38.php](http://www.chromatography-online.org/Detectors/Flame-Ionization/rs_2_38.php)>. Acesso em 08.03.2017.

DA ROS, Simoní et al. “Microkinetic analysis of ethanol to 1, 3-butadiene reactions over MgO-SiO<sub>2</sub> catalysts based on characterization of experimental fluctuations”. **Chemical Engineering Journal**, v. 308, p. 988-1000, 2017.

DA SILVA FILHO, Eurípedes Alves et al. “Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation”. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 10, p. 481-486, 2005.

DEAK, Tibor. **Handbook of food spoilage yeasts**. CRC press, 2007.

DERRICK, Simon; LARGE, Peter J. “Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source”. **Microbiology**, v. 139, n. 11, p. 2783-2792, 1993.

DIAS, Disney Ribeiro. **Elaboração de bebida fermentada a partir de frutas tropicais**. D.Sc. Universidade Federal de Lavras, 2001.

ECHEGARAY, O. F. et al. "Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation". **Biomass and Bioenergy**, v. 19, n. 1, p. 39-50, 2000.

ENGAN, Sigmund. "Wort composition and beer flavour. I. The influence of some amino acids on the formation of higher aliphatic alcohols and esters". **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, n. 3, p. 254-261, 1970.

ESTELA- ESCALANTE, W. D. et al. "Evaluation of the fermentative potential of *Candida zemplinina* yeasts for craft beer fermentation". **Journal of the Institute of Brewing**, v. 122, n. 3, p. 530-535, 2016.

ETSCHMANN, M. M. W.; SELL, D.; SCHRADER, J. "Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium". **Biotechnology letters**, v. 25, n. 7, p. 531-536, 2003.

FERRARIS, G. Buzzi. "Statistical tests and confidence intervals". **Computers & Chemical Engineering**, v. 24, n. 8, p. 2037-2039, 2000.

FROMENT, Gilbert F.; BISCHOFF, Kenneth B. **Chemical reactor analysis and design**. Wiley, 1979.

GAROFALO, Cristiana et al. "The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production". **Journal of food science**, v. 80, n. 12, p. M2845-M2852, 2015.

HAZELWOOD, Lucie A. et al. "The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism". **Applied and environmental microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2259-2266, 2008.

HEMOCYTOMETER. Hemocytometer website, 2015. Disponível em: <<http://www.hemocytometer.org/>>. Acesso em 22.03.2016.

HIRALAL, Lettisha; OLANIRAN, Ademola O.; PILLAY, Balakrishna. "Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions". **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 117, n. 1, p. 57-64, 2014.

JONES, Heather L.; MARGARITIS, Argyrios; STEWART, Robert J. The Combined “Effects of Oxygen Supply Strategy, Inoculum Size and Temperature Profile on Very-High-Gravity Beer Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*”. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, n. 2, p. 168-184, 2007.

KODAMA, Yukiko et al. “Control of higher alcohol production by manipulation of the BAP2 gene in brewing yeast”. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, n. 4, p. 157-162, 2001.

KUNZE, Wolfgang; MIETH, H. O. **Technology brewing and malting**. Berlin: Vlb, 2004.

LARENTIS, Ariane Leites et al. “Analysis of experimental errors in catalytic tests for production of synthesis gas”. **Applied Catalysis A: General**, v. 242, n. 2, p. 365-379, 2003.

LIBKIND, Diego et al. “Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast”. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 35, p. 14539-14544, 2011.

LILLIE, Sue H.; PRINGLE, John R. “Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation”. **Journal of bacteriology**, v. 143, n. 3, p. 1384-1394, 1980.

MAJORS, Ronald E. **Salting-out liquid-liquid extraction**. LC GC North America, v. 27, n. 7, 2009.

MAS, Albert et al. “Bioactive compounds derived from the yeast metabolism of aromatic amino acids during alcoholic fermentation”. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MENEZES, Tobias J. **Etanol, o combustível do Brasil**. In: Etanol, o combustível do Brasil. Ed. Agronomica Ceres, 1980.

MERRITT, N. R. “The influence of temperature on some properties of yeast”. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 72, n. 4, p. 374-383, 1966.

NADOLNY, Marina Scheiffer et al. “Estudo da corrosão do aço AISI 304 utilizado em materiais para cromatografia gasosa na medição do álcool não queimado”. **Blucher Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 491-501, 2014.

OHNO, T.; TAKAHASHI, R. “Role of wort aeration in the brewing process part 2: The optimal aeration conditions for the brewing process”. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, n. 1, p. 88-92, 1986.

OLIVEIRA, Anderson Rodrigo Moraes de et al. “Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos”. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.

OSHITA, K. et al. **Clarification of the relationship between fusel alcohol formation and amino acid assimilation by brewing yeast using  $^{13}\text{C}$ -labeled amino acid**. In: PROCEEDINGS OF CONGRESS-EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Oxford University Press, 1995. p. 387-387

PARCUNEV, Ivan et al. “Modeling of Alcohol Fermentation in Brewing—Some Practical Approaches”. **Yeast**, v. 2, p. 2, 2012.

PEDDIE, Hilary AB. “Ester formation in brewery fermentations”. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 96, n. 5, p. 327-331, 1990.

PIRES, Eduardo J. et al. “Yeast: the soul of beer’s aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast”. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 5, p. 1937-1949, 2014.

PROTZ, Roger. “When people of the ancient world realised they could make bread and beer from grain, they stopped roaming and settled down to cultivate cereals in recognisable communities”. **The complete guide to World beer**, 2004.

QUÍMICA INSTRUMENTAL. Química instrumental website. Cromatografia Gasosa. <[quimicainstrumental.wikispaces.com/5.3+Cromatografia+gasosa++instrumentação](http://quimicainstrumental.wikispaces.com/5.3+Cromatografia+gasosa++instrumentação)>. Acesso em 07.03.2017.

REAZIN, George; SCALES, Harry; ANDREASEN, Arthur. “Mechanism of major congener formation in alcoholic grain fermentations”. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 585-589, 1970.

REIFENBERGER, Elke; BOLES, Eckhard; CIRIACY, Michael. “Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression”. **European journal of biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 324-333, 1997.

SCHMIDELL, Willibaldo et al. **Biotecnologia industrial**. São Paulo, v. 3, 2001.

SCHWAAB, Marcio; PINTO, José C. **Análise de dados experimentais II—planejamento de experimentos**. Rio de Janeiro: E-papers, 2011.

SCHWAAB, Márcio; PINTO, J. C. **Análise de dados experimentais I. Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros**, v. 1, 2007.

SIQUEIRA, Priscila Becker; BOLINI, Helena Maria André; MACEDO, Gabriela Alves. “O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis”. **Alimentos e Nutrição**, v. 19, n. 4, p. 491-498, 2008.

STARR, Patricia R.; PARKS, L. W. “Effect of temperature on sterol metabolism in yeast”. **Journal of Cellular Physiology**, v. 59, n. 2, p. 107-110, 1962.

SZLAVKO, Clara M. “The influence of wort glucose level on the formation of aromatic higher alcohols”. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 80, n. 6, p. 534-539, 1974.

SZLAVKO, Clara M. “Tryptophol, tyrosol and phenylethanol—the aromatic higher alcohols in beer”. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, n. 4, p. 283-288, 1973.

TRINDADE, Vera Maria Treis. **A bioquímica da produção da cerveja**. A bioquímica como ela é website, 2014. Disponível em: < <https://abioquimicacomoeae.com.br/6-numeros-anteriores/numero-2/4-espaco-dos-convidados/a-bioquimica-da-producao-de-cerveja/>>. Acesso em: 09.07.2017.

TURCOTTE, Bernard et al. "Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast". **FEMS yeast research**, v. 10, n. 1, p. 2-13, 2009.

WHITE, Chris; ZAINASHEFF, Jamil. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Brewers Publications, 2010.

WIN, S. S.; IMPOOLSUP, A.; NOOMHORM, A. "Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fedbatch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch". **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 117-123, 1996.

WOO, Nancy; THET, Kyaw. Gas Chromatography. Chemistry libretexts website, 2015. Disponível em: <[https://chem.libretexts.org/Core/Analytical\\_Chemistry/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Gas\\_Chromatography](https://chem.libretexts.org/Core/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography)>. Acesso em 08.03.2017

TUBB, R. S.; LILJESTROM, P. L. "A colony-colour method which differentiates  $\alpha$ -galactosidase-positive strains of yeast". **Journal of the Institute of Brewing**, v. 92, n. 6, p. 588-590, 1986.

YE, Ling et al. "Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter". **Journal of bacteriology**, v. 181, n. 15, p. 4673-4675, 1999.

YEASTPATHWAYS. Yeast Genome website, 2015. Disponível em: <<http://pathway.yeastgenome.org/>>. Acesso em: 12.02.2017.

# APÊNDICE A

## - Curvas de calibração dos metabólitos voláteis

### A.1 Tabelas e gráficos

Tabela 14: Dados obtidos para elaborar curva de calibração do etanol.

Concentração (g/L)	Área do pico
60	5083,4
40	3283,4
20	1616,9
10	701,4
5	356,2
0,8	96,6
60	5101,2
40	3259,2
20	1595,7
10	711,5
5	356
0,8	109,8

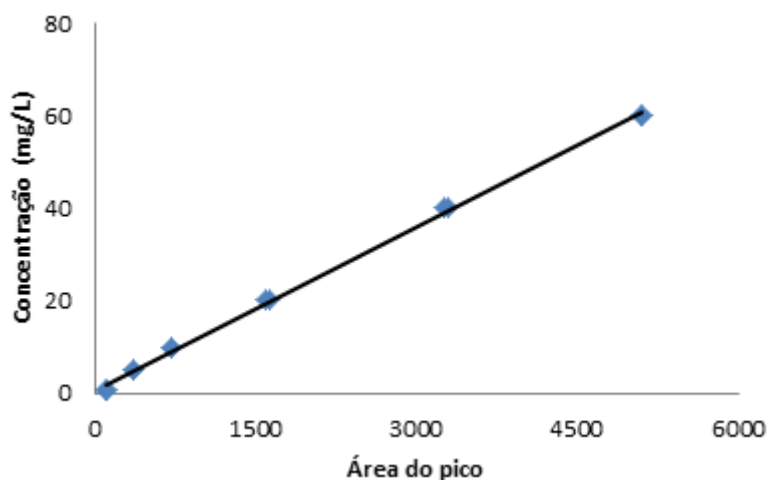


Figura 51. Curva de calibração do etanol.



Tabela 15: Dados obtidos para elaborar curva de calibração do 2-metil-1-butanol

Concentração (mg/L)	Área do pico
80	413,6
60	332,6
40	252
20	128,5
10	60,2
5	27,4
0,8	11,5
80	418,9
60	335,4
40	251,9
20	127,9
10	60,7
5	29,5
0,8	11,6

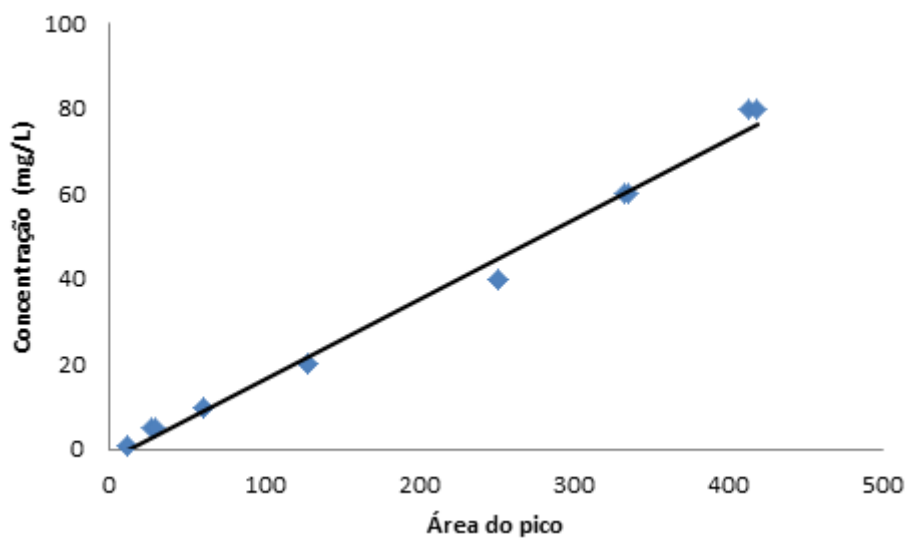


Figura 52. Curva de calibração do 2-metil-1-butanol

Tabela 16: Dados obtidos para elaborar curva de calibração do acetaldeído.

Concentração (mg/L)	Área do pico
133	115,8
64,5	55,3
31,92	32,6
13,3	15,5
6,65	5,4
2,66	2,8
1,3	1,42
133	117,2
64,5	55
31,92	32,2
13,3	15,3
6,65	5,2
2,66	2,7
1,3	1,45

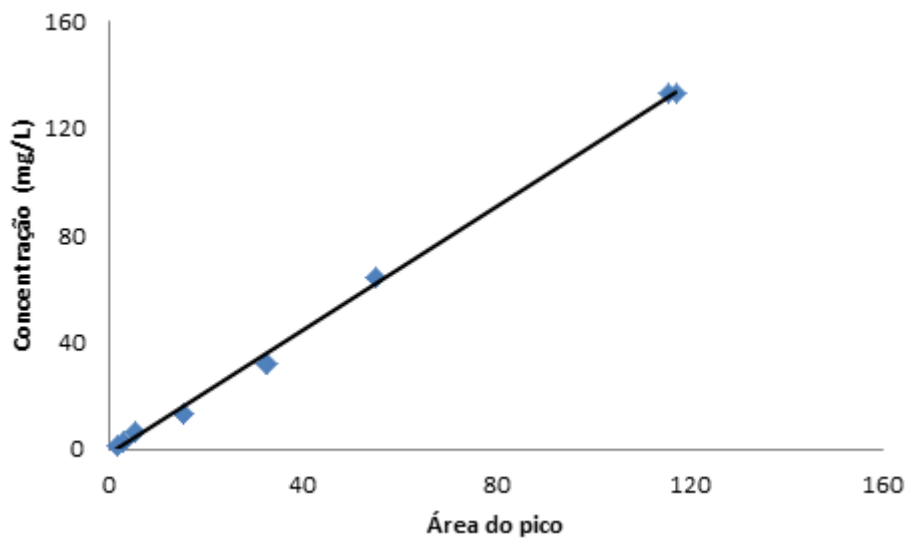


Figura 53. Curva de calibração do acetaldeído

Tabela 17: Dados obtidos para elaborar curva de calibração do triptofol.

Concentração (mg/L)	Área do pico
88	352,3
60	244,7
47	204,6
20	109,7
10	48,7
6	35,5
88	350,7
60	244,1
47	207
20	110,2
10	58
6	41,6

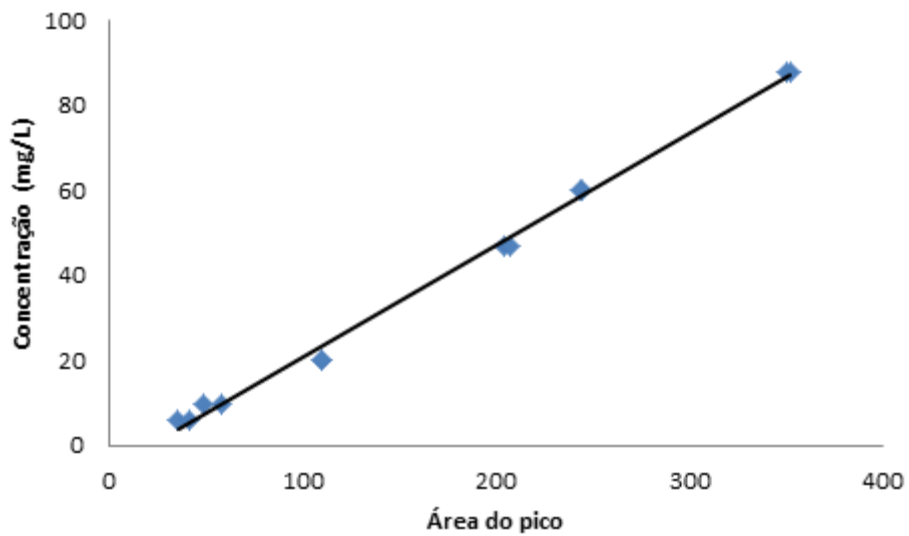


Figura 54. Curva de calibração do triptofol

Tabela 18: Dados obtidos para elaborar curva de calibração do Álcool fenetílico.

Concentração (mg/L)	Área do pico
60	273,4
40	196,8
20	99,1
10	45,1
5	19,5
0,8	1,77
167,7	840,3
80	352,3
60	276,6
40	193,4
20	107,2
10	41,7
5	20
0,8	1,77

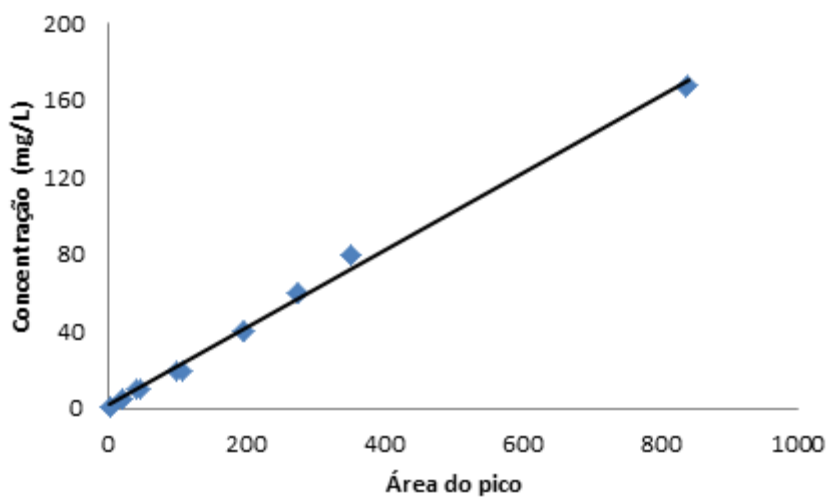


Figura 55. Curva de calibração do Álcool fenetílico.

Tabela 19: Dados obtidos para elaborar curva de calibração do acetato de isopentila.

Concentração (mg/L)	Área do pico
1,72	7
1,2825	4,9
0,855	3,1
0,4275	1,5
0,342	1
0,171	0,42
1,72	7,1
1,2825	5
0,855	3,2
0,4275	1,5
0,342	1,1
0,171	0,41

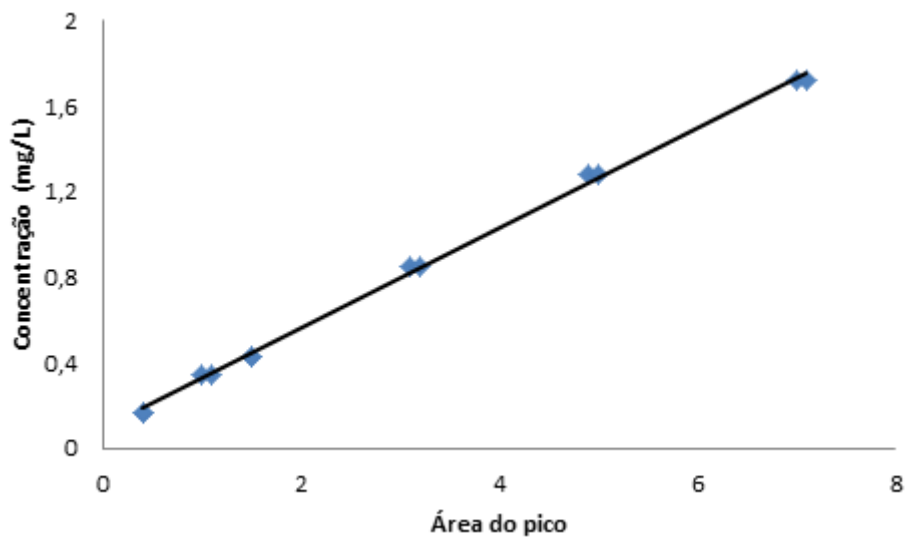


Figura 56. Curva de calibração do acetato de isopentila.

## A.2. Equações

$$C_{\text{etanol}} (\text{mg/L}) = 0,0118 * \text{Área do pico} + 0,8253 \quad (\text{a.1})$$

$$R^2 = 0,9987$$

$$C_{2\text{mb}} (\text{mg/L}) = 0,1883 * \text{Área do pico} - 2,2801 \quad (\text{a.2})$$

$$R^2 = 0,9906$$

$$C_{\text{acetaldeído}} (\text{mg/L}) = 1,1529 * \text{Área do pico} - 1,5164 \quad (\text{a.3})$$

$$R^2 = 0,9973$$

$$C_{\text{triptofol}} (\text{mg/L}) = 0,264 * \text{Área do pico} - 5,6482 \quad (\text{a.4})$$

$$R^2 = 0,9955$$

$$C_{\text{FEA}} (\text{mg/L}) = 0,2013 * \text{Área do pico} + 1,9 \quad (\text{a.5})$$

$$R^2 = 0,996$$

$$C_{\text{AI}} (\text{mg/L}) = 0,2352 * \text{Área do pico} - 0,0897 \quad (\text{a.6})$$

$$R^2 = 0,9982$$

## - Curvas de calibração das leveduras

### A.3. Tabelas e gráficos

Tabela 20. Dados obtidos para elaborar curva de calibração para contagem celular.

Abs (nm)	Concentração (g de cel/mL)
0,682	6,938
0,576	5,781
0,462	4,625
0,342	3,469
0,25	2,313
0,154	1,388

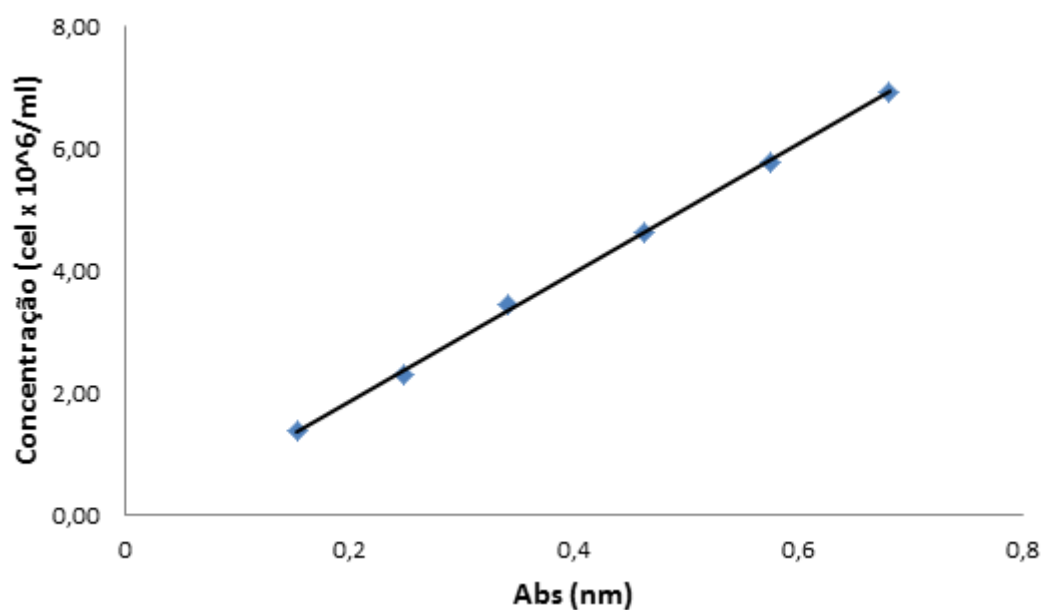


Figura 57. Curva de calibração para contagem celular.

Tabela 21. Dados obtidos para elaborar curva de calibração de peso seco.

<b>Abs (nm)</b>	<b>Concentração (g de cel/mL)</b>
0,682	0,079
0,576	0,066
0,462	0,052
0,342	0,04
0,25	0,026
0,154	0,016

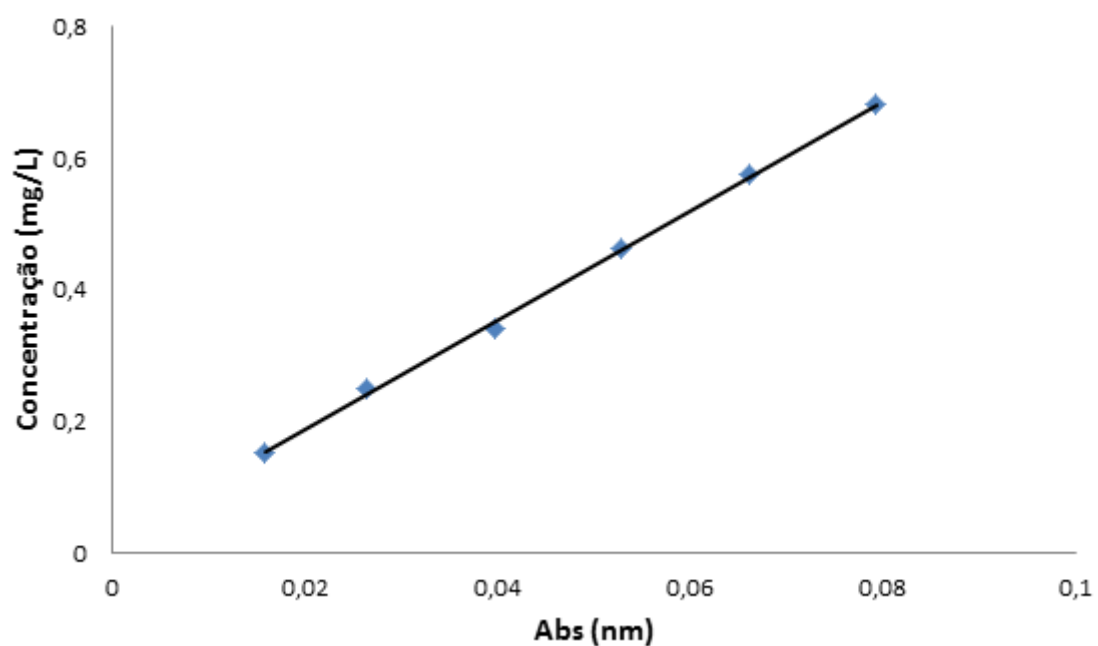


Figura 58. Curva de calibração de peso seco x densidade ótica.



## A.4. Equações

$$\text{Concentração} \left( \frac{10^6 \text{ cel}}{\text{mL}} \right) = 10,508 * \text{Abs} (nm) - 0,2318 \quad (\text{a.7})$$

$$R^2 = 0,9992$$

$$\text{Concentração} \left( \frac{g}{\text{mL}} \right) = 0,1202 * \text{Abs} (nm) - 0,0027 \quad (\text{a.8})$$

$$R^2 = 0,9992$$

# APÊNDICE B

## B.1. Dados experimentais obtidos para todas as condições de fermentação

Tabela 22. Dados experimentais obtidos para o experimento F01 (T=23°C e °Br inicial=15) do dia 1 ao dia 3.

	Réplica	Concentração (mg/L)					
Horas	DIA 1	Etanol	2m1b	Acetaldeído	Triptofol	FEA	AI
24	1.1	22084,77	13,03	3,90	4,81	42,92	0,58
24	2.1	23131,43	14,27	4,25	7,34	43,07	0,65
24	3.1	20738,98	11,33	3,90	4,76	36,10	0,54
24	4.1	21169,09	13,33	4,02	5,49	39,76	0,68
24	5.1	21499,49	13,25	4,25	6,79	37,85	0,65
24	6.1	19884,66	12,59	3,90	5,67	36,72	0,61
24	7.1	20485,28	11,56	4,13	4,89	36,68	0,61
24	8.1	20269,93	12,66	4,02	5,54	40,45	0,63
24	9.1	21515,42	13,87	3,56	7,18	34,99	0,72
24	10.1	21008,61	13,87	4,48	8,04	37,91	0,68
	DIA 2						
48	1.2	33709,54	25,06	7,59	2,68	43,29	1,05
48	2.2	34238,18	24,18	4,94	3,61	45,08	1,05
48	3.2	34222,84	22,51	5,06	2,63	46,35	0,96
48	4.2	33630,48	23,18	5,52	2,21	44,80	1,01
48	5.2	32819,82	23,12	5,06	2,57	43,57	1,03
48	6.2	33736,68	24,68	5,75	1,92	46,71	1,03
48	7.2	31645,72	20,09	5,29	1,95	40,81	0,80
48	8.2	32521,28	22,34	6,21	2,89	39,02	1,05
48	9.2	32569,66	23,73	5,17	2,52	40,29	1,15
48	10.2	25704,42	20,38	5,52	2,36	36,52	0,89
	DIA 3						
72	1.3	36598,18	27,17	23,39	2,91	47,17	1,08
72	2.3	38957,00	29,40	15,78	4,71	47,27	1,10
72	3.3	39932,86	30,51	14,62	3,72	52,06	1,20
72	4.3	36881,38	25,06	11,63	3,59	46,87	1,01
72	5.3	37302,64	28,18	13,01	3,30	44,43	1,27
72	6.3	38900,36	27,52	14,51	4,42	48,36	1,05
72	7.3	36723,26	26,64	18,77	2,73	48,05	0,91
72	8.3	36182,82	26,96	16,01	4,16	45,24	1,17
72	9.3	37753,40	29,36	16,12	3,82	47,54	1,34
72	10.3	38112,12	28,09	20,97	4,03	25,38	1,08

Tabela 23. Dados experimentais obtidos para o experimento F01 do dia 4 ao último dia de maturação (Dia M).

<b>Horas</b>	<b>Réplica</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>					
	<b>DIA 4</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
96	1.4	35250,62	33,91	25,92	3,35	42,08	1,15
96	2.4	41459,78	35,80	16,58	5,80	50,82	1,24
96	3.4	38549,90	34,69	15,89	4,11	61,89	1,34
96	4.4	39742,88	33,93	15,09	4,92	48,62	1,27
96	5.4	37519,76	30,49	15,09	3,95	46,53	1,03
96	6.4	39976,52	35,11	20,39	5,36	49,43	1,17
96	7.4	37404,12	31,48	25,12	5,88	48,54	0,89
96	8.4	38011,82	31,29	21,31	5,75	47,01	0,89
96	9.4	39345,22	32,07	18,54	3,64	47,05	1,05
96	10.4	39123,38	33,30	22,58	4,94	47,86	1,08
	<b>DIA 5</b>						
144	1.5	37598,82	30,35	32,49	4,89	53,39	0,61
144	2.5	37896,18	33,21	26,61	4,47	50,80	0,77
144	3.5	40003,66	35,70	25,46	4,50	51,98	0,87
144	4.5	36421,18	29,31	17,74	4,40	45,26	0,68
144	5.5	39490,36	33,86	20,97	4,79	49,33	0,75
144	6.5	37052,48	28,91	21,08	4,16	44,50	0,56
144	7.5	37191,72	30,58	23,73	4,06	45,64	0,49
144	8.5	36571,04	29,59	21,08	4,92	46,02	0,44
144	9.5	36337,40	29,36	20,73	4,45	44,98	0,56
144	10.5	37339,22	32,54	26,27	5,36	47,17	0,54
	<b>DIA M</b>						
M	1.7	36917,96	27,88	37,91	3,07	44,29	0,00
M	2.7	37248,36	28,83	29,04	2,39	46,00	0,37
M	3.7	39067,92	32,35	29,27	4,92	48,24	0,37
M	4.7	36572,22	27,54	31,11	2,29	42,54	0,00
M	5.7	36810,58	27,59	30,19	2,89	44,86	0,00
M	6.7	37027,70	28,58	36,41	3,04	45,84	0,00
M	7.7	35799,32	25,88	33,99	2,78	44,60	0,00
M	8.7	36117,92	28,87	37,57	2,73	48,76	0,00
M	9.7	34897,80	27,14	29,50	3,77	47,66	0,00
M	10.7	37538,64	24,76	33,30	2,70	44,31	0,00

Tabela 24. Dados experimentais obtidos para o experimento F02 do dia 1 ao dia 3.

Horas	Réplica	Concentração (mg/L)					
	DIA 1	Etanol	2m1b	Acetaldeído	Triptofol	FEA	AI
24	1.1	22084,77	5,18	0,21	4,11	25,69	0,00
24	2.1	23131,43	6,31	1,48	3,30	30,26	0,00
24	3.1	20738,98	6,04	0,79	3,51	30,26	0,00
24	4.1	21169,09	5,09	0,44	3,07	28,85	0,00
24	5.1	21499,49	4,99	0,10	3,46	27,28	0,00
24	6.1	19884,66	5,70	1,25	3,72	30,89	0,00
24	7.1	20485,28	5,85	0,67	3,41	26,98	0,00
24	8.1	20269,93	5,30	0,21	3,09	27,79	0,00
24	9.1	21515,42	5,47	1,02	4,79	29,60	0,00
24	10.1	21008,61	4,61	0,10	3,17	27,95	0,00
	<b>DIA 2</b>						
48	1.2	21720,74	10,11	8,40	2,03	34,89	0,00
48	2.2	21791,54	10,61	2,17	3,07	37,91	0,00
48	3.2	23511,98	11,87	8,63	2,83	37,01	0,00
48	4.2	19934,22	8,76	1,94	1,66	33,36	0,00
48	5.2	23449,44	11,22	7,71	2,21	34,63	0,00
48	6.2	20724,82	9,43	1,71	3,28	38,07	0,00
48	7.2	19387,88	7,91	2,17	3,22	39,68	0,00
48	8.2	21654,66	9,70	1,48	2,70	39,30	0,00
48	9.2	22837,02	10,61	6,09	2,13	35,68	0,00
48	10.2	21710,12	11,10	9,09	3,80	39,44	0,00
	<b>DIA 3</b>						
72	1.3	22662,38	10,93	6,67	2,68	36,12	0,00
72	2.3	20608,00	8,51	5,86	3,56	33,02	0,00
72	3.3	21214,52	9,87	8,86	1,74	37,61	0,00
72	4.3	20422,74	5,30	9,09	4,63	38,58	0,00
72	5.3	21844,64	9,66	7,59	4,29	37,03	0,00
72	6.3	18171,30	6,61	5,80	4,29	35,90	0,00
72	7.3	20625,70	7,28	12,32	1,48	34,11	0,00
72	8.3	20343,68	9,92	8,97	2,57	37,73	0,00
72	9.3	20823,94	8,51	2,17	1,79	33,81	0,00
72	10.3	20701,22	8,04	7,59	3,17	34,67	0,00

Tabela 25. Dados experimentais obtidos para o experimento F02 do dia 4 ao último dia de maturação.

<b>Horas</b>	<b>Réplica</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>					
	<b>DIA 4</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
96	1.4	22059,40	11,69	10,24	3,69	33,62	0,00
96	2.4	23569,80	11,26	3,56	6,09	35,46	0,00
96	3.4	22307,20	11,90	12,43	3,88	40,85	0,00
96	4.4	15490,34	5,35	8,28	3,56	38,62	0,00
96	5.4	17215,50	6,34	3,79	2,42	42,40	0,00
96	6.4	16129,90	5,49	4,48	4,27	31,27	0,00
96	7.4	19481,10	7,11	7,48	1,11	34,03	0,00
96	8.4	20259,90	9,20	8,51	3,61	30,12	0,00
96	9.4	22667,10	8,53	9,44	2,13	32,42	0,00
96	10.4	13179,90	4,31	3,67	1,43	33,06	0,00
	<b>DIA 5</b>						
144	1.5	22422,84	13,05	11,05	3,41	35,32	0,00
144	2.5	19477,56	9,66	10,01	4,66	39,76	0,00
144	3.5	17794,88	6,74	4,82	3,98	35,36	0,00
144	4.5	12866,02	3,20	4,36	5,70	33,58	0,00
144	5.5	15765,28	5,01	5,40	2,23	35,42	0,00
144	6.5	11375,68	2,86	4,25	6,58	43,33	0,00
144	7.5	18850,98	8,50	9,44	3,61	41,17	0,00
144	8.5	17152,96	6,84	4,82	3,46	36,26	0,00
144	9.5	20252,82	8,17	7,02	3,41	33,18	0,00
144	10.5	6476,32	3,03	3,10	3,02	37,85	0,00
	<b>DIA M</b>						
M	1.7	22041,70	10,99	14,97	1,90	31,31	0,00
M	2.7	19164,86	8,08	11,74	1,74	37,93	0,00
M	3.7	16450,86	4,33	8,74	0,93	28,07	0,00
M	4.7	13489,06	3,16	9,55	1,64	42,95	0,00
M	5.7	13666,06	3,37	10,93	1,97	34,99	0,00
M	6.7	11126,70	3,77	16,35	1,01	30,95	0,00
M	7.7	17785,44	4,82	13,70	0,10	25,23	0,00
M	8.7	16747,04	4,02	8,74	0,12	28,55	0,00
M	9.7	18543,00	7,07	11,40	1,43	32,80	0,00
M	10.7	6633,26	4,34	8,63	1,35	31,81	0,00

Tabela 25. Dados experimentais obtidos para o experimento F02 do dia 4 ao último dia de maturação.

<u>Horas</u>	<u>Ponto</u>	<u>Concentração (mg/L)</u>					
	<u>DIA 1</u>	<u>Etanol</u>	<u>2m1b</u>	<u>Acetaldeído</u>	<u>Triptofol</u>	<u>FEA</u>	<u>AI</u>
24	1.1	11219,92	4,00	5,86	0,85	21,47	0,00
24	2.1	11879,54	4,19	5,63	1,74	19,86	0,00
24	3.1	11526,72	4,02	4,48	0,59	19,11	0,00
24	4.1	11261,22	3,89	4,94	0,00	18,17	0,00
24	5.1	10973,30	4,31	5,75	0,62	21,12	0,00
24	6.1	11038,20	4,06	5,17	0,72	18,33	0,00
24	7.1	11412,26	3,98	5,98	0,75	18,67	0,00
24	8.1	10775,06	3,32	5,63	0,00	16,31	0,00
24	9.1	10457,64	3,66	5,63	0,00	18,33	0,00
24	10.1	10313,68	7,32	3,90	1,71	21,95	0,00
	<b>DIA 2</b>						
48	1.2	21288,86	7,26	5,40	1,11	21,85	0,00
48	2.2	22251,74	7,83	5,98	1,11	23,23	0,27
48	3.2	22737,90	8,17	4,94	1,43	23,93	0,00
48	4.2	22795,72	7,98	5,06	0,85	27,24	0,00
48	5.2	22260,00	9,24	5,17	2,23	27,68	0,31
48	6.2	22401,60	8,48	5,75	1,22	23,81	0,00
48	7.2	22284,78	7,71	5,63	0,75	23,22	0,00
48	8.2	21906,00	7,94	5,29	0,72	24,86	0,00
48	9.2	22658,84	8,61	5,63	2,05	25,28	0,27
48	10.2	23475,40	9,58	6,32	2,26	13,06	0,00
	<b>DIA 3</b>						
72	1.3	27783,58	14,26	8,97	3,17	29,50	0,31
72	2.3	29299,88	15,81	9,78	2,57	30,08	0,36
72	3.3	29039,10	15,08	9,90	2,86	32,24	0,31
72	4.3	28619,02	15,98	8,74	2,05	29,50	0,41
72	5.3	33970,32	17,92	9,09	3,46	38,82	0,39
72	6.3	29175,98	15,58	9,78	4,94	29,44	0,34
72	7.3	28368,86	15,33	9,09	3,09	29,78	0,36
72	8.3	27608,94	11,64	8,97	1,22	26,98	0,24
72	9.3	28089,20	14,30	10,01	2,26	28,65	0,29
72	10.3	28354,70	14,11	9,67	2,05	27,14	0,27

Tabela 27. Dados experimentais obtidos para o experimento F03 do dia 4 ao último dia de maturação.

<u>Horas</u>	<u>Ponto</u>	<u>Concentração (mg/L)</u>					
	<u>DIA 4</u>	<u>Etanol</u>	<u>2m1b</u>	<u>Acetaldeído</u>	<u>Triptofol</u>	<u>FEA</u>	<u>AI</u>
96	1.4	27962,94	14,85	7,71	2,83	30,71	0,39
96	2.4	27841,40	15,37	11,17	1,90	33,38	0,36
96	3.4	28296,88	13,69	8,17	2,08	25,51	0,01
96	4.4	29396,64	15,12	10,93	1,74	34,31	0,31
96	5.4	28976,56	13,60	10,01	2,00	23,72	0,24
96	6.4	30173,08	16,66	10,82	2,47	29,88	0,36
96	7.4	29081,58	13,98	8,97	1,90	25,83	0,01
96	8.4	28971,84	15,69	8,86	2,03	24,71	0,34
96	9.4	29048,54	13,20	9,09	1,64	33,97	0,24
96	10.4	29528,80	16,55	11,17	2,76	33,36	0,27
	<b>DIA 5</b>						
144	1.5	27572,36	13,33	8,28	1,90	34,09	0,00
144	2.5	28378,30	14,55	10,47	1,69	27,87	0,00
144	3.5	27962,94	14,42	9,78	2,05	30,22	0,24
144	4.5	27833,14	17,16	10,01	2,36	38,38	0,31
144	5.5	30046,82	17,46	15,32	2,94	41,78	0,29
144	6.5	29655,06	15,90	11,74	2,16	37,39	0,27
144	7.5	29317,58	16,59	12,55	2,81	34,15	0,27
144	8.5	28093,92	14,38	6,78	1,71	26,62	0,00
144	9.5	29242,06	13,54	11,05	2,23	25,65	0,00
144	10.5	28706,34	14,76	14,51	2,03	29,74	0,00
	<b>DIA M</b>						
M	1.6	30901,14	20,78	24,08	5,05	39,38	0,00
M	2.6	29246,78	16,51	19,70	2,00	33,81	0,00
M	3.6	29867,46	17,52	11,74	2,96	33,62	0,00
M	4.6	30142,40	17,35	9,67	2,39	32,50	0,00
M	5.6	31912,40	18,02	19,01	3,43	34,21	0,00
M	6.6	30397,28	16,87	17,16	2,21	32,28	0,00
M	7.6	31482,88	15,08	8,74	1,95	35,42	0,00
M	8.6	29981,92	12,86	10,01	0,75	23,74	0,00
M	9.6	29574,82	14,42	10,47	5,15	28,67	0,00
M	10.6	30743,02	15,56	12,43	1,69	29,50	0,00

Tabela 28. Dados experimentais obtidos para o experimento F04 do dia 1 ao dia 3.

<b>Horas</b>	<b>Ponto</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>					
	<b>DIA 1</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
24	1.1	4722,84	0,27	12,20	0,00	5,08	0,00
24	2.1	4824,32	0,06	11,05	0,00	5,02	0,00
24	3.1	4719,30	0,00	10,59	0,00	4,46	0,00
24	4.1	4443,18	0,00	10,59	0,00	4,30	0,00
24	5.1	4557,64	0,00	10,47	0,00	4,66	0,00
24	6.1	4551,74	0,00	10,70	0,00	4,28	0,00
24	7.1	4526,96	0,06	11,05	0,00	4,92	0,00
24	8.1	4581,24	0,18	11,97	0,00	4,96	0,00
24	9.1	4812,52	0,00	9,78	0,00	5,34	0,00
24	10.1	4565,90	0,04	10,93	0,00	4,64	0,00
	<b>DIA 2</b>						
48	1.2	18744,78	8,29	7,02	4,27	28,59	0,00
48	2.2	19495,26	9,92	6,90	4,84	34,85	0,00
48	3.2	18474,56	8,65	6,55	4,40	33,04	0,00
48	4.2	18242,10	7,98	6,67	3,61	24,61	0,00
48	5.2	18801,42	10,06	5,98	6,12	28,33	0,00
48	6.2	18592,56	8,72	7,13	4,47	28,01	0,00
48	7.2	20763,76	11,52	7,36	6,56	35,44	0,00
48	8.2	19497,62	10,32	7,59	5,49	28,97	0,00
48	9.2	21328,98	10,63	7,48	6,51	31,03	0,00
48	10.2	18894,64	9,45	6,55	5,18	26,06	0,00
	<b>DIA 3</b>						
72	1.3	30971,94	16,57	8,74	6,38	32,80	0,61
72	2.3	30596,70	14,82	7,48	3,85	28,75	0,51
72	3.3	29960,68	14,32	7,13	4,81	27,16	0,47
72	4.3	28862,10	13,79	7,59	3,28	28,39	0,44
72	5.3	30150,66	15,25	6,09	3,93	29,23	0,49
72	6.3	29201,94	14,26	7,36	3,69	31,78	0,47
72	7.3	33421,62	18,68	8,74	7,55	31,27	0,65
72	8.3	30057,44	14,82	6,67	4,40	27,75	0,49
72	9.3	30252,14	13,98	7,94	4,47	27,41	0,47
72	10.3	29576,00	13,60	8,05	3,64	14,58	0,58



Tabela 29. Dados experimentais obtidos para o experimento F04 do dia 4 ao dia 6.

<b>Horas</b>	<b>Ponto</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>					
	<b>DIA 4</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
96	1.4	34717,26	18,70	10,70	4,50	30,38	0,58
96	2.4	34749,12	18,49	10,70	4,40	29,20	0,47
96	3.4	33681,22	17,35	10,82	2,96	28,25	0,70
96	4.4	29850,94	16,38	9,67	2,39	26,98	0,61
96	5.4	30687,56	16,02	8,86	2,44	25,27	0,54
96	6.4	32964,96	16,89	10,36	3,43	26,40	0,42
96	7.4	33317,78	16,74	10,70	4,01	26,76	0,47
96	8.4	33641,10	21,80	10,59	4,71	29,28	0,63
96	9.4	33448,76	21,42	8,97	4,32	28,51	0,70
96	10.4	34592,18	19,73	10,93	3,88	30,48	0,49
	<b>DIA 5</b>						
144	1.5	36445,96	20,49	14,62	4,60	33,93	0,44
144	2.5	29695,18	15,10	8,86	1,79	24,73	0,37
144	3.5	35944,46	21,02	14,16	5,13	31,21	0,37
144	4.5	36397,58	22,57	17,39	4,66	35,05	0,40
144	5.5	37104,40	21,33	12,20	4,87	30,40	0,32
144	6.5	34165,02	19,65	17,05	3,35	31,27	0,35
144	7.5	38001,20	21,88	20,97	5,00	33,42	0,51
144	8.5	36620,60	22,19	22,46	4,71	30,93	0,40
144	9.5	37229,48	22,93	15,43	5,33	33,26	0,44
144	10.5	37128,00	22,66	13,59	4,58	33,52	0,49
	<b>DIA 6</b>						
168	1.6	39724,00	25,00	13,82	5,65	35,66	0,40
168	2.6	39049,04	26,55	11,40	6,56	39,32	0,37
168	3.6	35821,74	25,23	14,16	5,83	39,64	0,40
168	4.6	39423,10	25,65	16,01	5,65	37,13	0,09
168	5.6	39666,18	25,69	12,78	5,88	35,13	0,09
168	6.6	39118,66	26,36	10,59	5,59	38,01	0,40
168	7.6	38653,74	26,41	15,66	5,91	37,71	0,47
168	8.6	37553,98	24,95	11,63	5,36	36,50	0,09
168	9.6	36782,26	25,29	13,13	2,96	37,43	0,44
168	10.6	36417,64	25,00	15,43	6,06	38,58	0,49

Tabela 30. Dados experimentais obtidos para o experimento F04 no último dia de maturação.

<b>Horas</b>	<b>Ponto</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>					
	<b>DIA M</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
<b>M</b>	<b>1.6</b>	39152,88	25,61	16,47	5,91	36,70	0,35
<b>M</b>	<b>2.6</b>	38761,12	25,94	15,66	6,32	35,86	0,00
<b>M</b>	<b>3.6</b>	38349,30	25,31	42,87	6,04	36,20	0,00
<b>M</b>	<b>4.6</b>	39975,34	27,31	34,57	6,71	39,52	0,37
<b>M</b>	<b>5.6</b>	39423,10	26,39	20,39	5,88	37,79	0,00
<b>M</b>	<b>6.6</b>	39080,90	26,32	31,34	6,92	37,81	0,00
<b>M</b>	<b>7.6</b>	38446,06	25,92	28,80	5,93	38,07	0,32
<b>M</b>	<b>8.6</b>	36163,94	26,13	37,22	6,32	36,10	0,37
<b>M</b>	<b>9.6</b>	29223,18	24,79	21,43	2,83	34,79	0,00
<b>M</b>	<b>10.6</b>	37017,08	24,93	29,84	5,78	42,38	0,32

Tabela 31. Dados experimentais obtidos para o experimento F05 dos dias 1 e 2.

<b>Horas</b>	<b>Ponto</b>	<b>Concentração</b>					
	<b>DIA 1</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
<b>24</b>	<b>1.1</b>	3711,58	0,00	7,13	0,00	4,15	0,00
<b>24</b>	<b>2.1</b>	3741,08	0,00	6,78	0,00	3,91	0,00
<b>24</b>	<b>3.1</b>	3741,08	0,00	6,44	0,00	4,01	0,00
<b>24</b>	<b>4.1</b>	3870,88	0,00	6,67	0,00	4,03	0,00
<b>24</b>	<b>5.1</b>	3652,58	0,00	7,13	0,00	3,79	0,00
<b>24</b>	<b>6.1</b>	3662,02	0,00	6,09	0,00	3,71	0,00
<b>24</b>	<b>7.1</b>	3722,20	0,00	7,36	0,00	4,11	0,00
<b>24</b>	<b>8.1</b>	3612,46	0,00	6,78	0,00	3,75	0,00
<b>24</b>	<b>9.1</b>	3690,34	0,00	6,78	0,00	3,79	0,00
<b>24</b>	<b>10.1</b>	3771,76	0,00	8,17	0,00	4,15	0,00
	<b>DIA 2</b>						
<b>48</b>	<b>1.2</b>	13351,00	4,02	6,32	0,15	19,76	0,00
<b>48</b>	<b>2.2</b>	13798,22	4,74	5,86	0,00	22,61	0,00
<b>48</b>	<b>3.2</b>	13018,24	3,75	5,63	0,00	19,47	0,00
<b>48</b>	<b>4.2</b>	12934,46	4,04	4,36	0,00	19,45	0,00
<b>48</b>	<b>5.2</b>	12680,76	2,76	5,17	0,00	15,11	0,00
<b>48</b>	<b>6.2</b>	12745,66	2,69	5,98	0,00	15,27	0,00
<b>48</b>	<b>7.2</b>	12163,92	3,37	6,44	0,00	17,70	0,00
<b>48</b>	<b>8.2</b>	13031,22	3,93	6,55	0,00	18,97	0,00
<b>48</b>	<b>9.2</b>	13019,42	2,65	5,17	0,00	15,81	0,00
<b>48</b>	<b>10.2</b>	12447,12	2,76	4,94	0,00	16,90	0,00

Tabela 32. Dados experimentais obtidos para o experimento F05 do dia 3 ao dia 5.

<b>Horas</b>	<b>Ponto</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>					
	<b>DIA 3</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
72	1.3	21478,84	8,91	7,59	4,74	25,65	0,00
72	2.3	20764,94	7,62	7,13	3,20	22,51	0,00
72	3.3	18999,66	5,51	6,21	3,41	20,40	0,00
72	4.3	20394,42	6,34	6,21	3,43	22,77	0,00
72	5.3	20860,52	6,78	5,98	3,04	21,97	0,00
72	6.3	20793,26	7,60	7,25	3,38	22,39	0,00
72	7.3	21049,32	6,76	6,44	3,95	24,63	0,00
72	8.3	20452,24	7,01	6,55	3,33	21,57	0,00
72	9.3	20880,58	7,14	7,13	3,30	22,25	0,00
72	10.3	20465,22	6,88	6,78	3,56	22,82	0,00
	<b>DIA 4</b>						
96	1.4	20279,96	8,23	10,01	3,85	24,12	0,00
96	2.4	20226,86	8,70	12,43	3,28	24,75	0,00
96	3.4	20225,68	7,33	7,48	4,32	25,21	0,00
96	4.4	20544,28	6,82	9,44	2,18	23,20	0,00
96	5.4	20475,84	6,40	8,40	3,38	22,59	0,00
96	6.4	14824,82	3,35	6,67	0,07	26,22	0,00
96	7.4	21772,66	8,32	7,82	4,19	24,57	0,00
96	8.4	19483,46	10,19	7,36	4,63	24,75	0,00
96	9.4	20231,58	7,30	10,01	2,78	23,34	0,00
96	10.4	20937,22	7,07	9,09	2,42	25,55	0,00
	<b>DIA 5</b>						
144	1.5	21076,46	6,92	6,78	3,15	22,27	0,00
144	2.5	23051,78	10,76	10,70	5,26	29,94	0,00
144	3.5	20353,12	8,42	7,82	5,93	31,39	0,00
144	4.5	18661,00	8,61	5,29	6,19	33,58	0,00
144	5.5	20065,20	5,52	6,21	6,14	27,91	0,00
144	6.5	20576,14	8,53	7,48	5,62	28,79	0,00
144	7.5	10870,05	8,82	7,25	5,00	15,77	0,00
144	8.5	10241,11	7,64	7,13	4,87	14,54	0,00
144	9.5	11985,15	10,13	10,82	4,89	15,30	0,00
144	10.5	11986,33	10,02	7,13	5,91	15,68	0,00

Tabela 33. Dados experimentais obtidos para o experimento F05 do dia 6 e do último dia de maturação.

<b>Horas</b>	<b>Ponto</b>	<b>Concentração (mg/L)</b>					
	<b>DIA 6</b>	<b>Etanol</b>	<b>2m1b</b>	<b>Acetaldeído</b>	<b>Triptofol</b>	<b>FEA</b>	<b>AI</b>
168	1.6	9825,16	6,95	6,21	5,23	16,51	0,00
168	2.6	12129,11	10,49	9,55	6,01	15,77	0,00
168	3.6	8728,94	5,24	5,40	4,74	16,81	0,00
168	4.6	10085,35	7,01	7,02	6,01	16,88	0,00
168	5.6	9079,40	5,60	8,40	4,24	15,83	0,00
168	6.6	10642,31	7,91	8,05	4,97	15,69	0,00
168	7.6	10765,03	7,81	7,25	5,07	15,83	0,00
168	8.6	10784,50	8,99	8,40	6,58	17,10	0,00
168	9.6	11625,25	9,68	6,55	5,02	14,34	0,00
168	10.6	11598,11	9,20	6,55	6,17	15,75	0,00
	<b>DIA M</b>						
M	1.6	9604,50	6,86	18,20	5,02	18,86	0,00
M	2.6	11146,76	9,28	15,55	5,10	16,65	0,00
M	3.6	9003,29	5,73	16,01	5,05	16,77	0,00
M	4.6	9669,40	6,67	15,43	5,52	30,75	0,00
M	5.6	9032,20	5,77	14,05	4,76	30,38	0,00
M	6.6	11176,85	8,36	12,66	5,05	31,89	0,00
M	7.6	9997,44	6,63	16,58	5,46	30,59	0,00
M	8.6	9550,81	6,17	14,05	5,13	32,16	0,00
M	9.6	10975,07	8,50	15,32	6,27	28,35	0,00
M	10.6	11725,55	9,12	9,90	5,57	31,57	0,00

## B.2. Valores de média e variância para cada metabólito nos ensaios

Tabela 34. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de etanol (mg/L) nos experimentos F01, F02 e F03.

<b>Tempo</b>	<b>Etanol</b>					
	<b>F01</b>		<b>F02</b>		<b>F03</b>	
	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>
24hr	21178,77	805401,42	21178,77	805401,42	11085,75	208200,57
48hr	32479,86	5727303,35	21672,24	1705474,30	22406,08	302741,12
72hr	37734,40	1346533,36	20741,81	1203589,22	29030,96	3002110,04
98hr	38638,40	2635771,71	19236,01	11350316,54	28927,83	468355,75
144hr	37590,21	1401481,80	16243,53	20548042,53	28680,85	643477,11
312 hr	36799,84	1109279,26	15564,80	17827742,51	30425,01	635812,52

Tabela 35. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de etanol (mg/L) nos experimentos F04 e F05.

Tempo	Etanol			
	F04		F05	
	Média	Variância	Média	Variância
24hr	4630,56	15103,03	3717,60	4670,23
48hr	19283,57	935597,62	12919,00	187203,85
72hr	30305,12	1427981,79	20613,90	382681,65
98hr	33165,09	2471352,44	19900,24	3172754,61
144hr	35873,19	5171077,91	16886,63	22284410,03
168 hr	38221,03	1899475,06	10526,32	1107264,20
312 hr	37559,29	8875250,68	10188,19	867173,77

Tabela 36. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de 2m1b (mg/L) nos experimentos F01, F02 e F03.

Tempo	2m1b					
	F01		F02		F03	
	Média	Variância	Média	Variância	Média	Variância
24hr	12,98	0,85	5,45	0,24	4,27	1,10
48hr	22,93	2,50	10,13	1,31	8,28	0,45
72hr	27,89	2,25	8,46	2,67	15,00	2,37
98hr	33,21	2,90	8,12	7,16	14,87	1,36
144hr	31,34	4,89	6,71	9,77	15,21	1,95
312 hr	27,94	3,69	5,40	5,74	16,50	4,30

Tabela 37. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de 2m1b (mg/L) nos experimentos F04 e F05.

Tempo	2m1b			
	F04		F05	
	Média	Variância	Média	Variância
24hr	0,06	0,01	0,00	0,00
48hr	9,55	1,16	3,47	0,48
72hr	15,01	2,16	7,06	0,72
98hr	18,35	3,85	7,37	2,88
144hr	20,98	4,81	8,54	2,23
168 hr	25,61	0,35	7,89	2,68
312 hr	25,86	0,50	7,31	1,69

Tabela 38. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de acetaldeído (mg/L) nos experimentos F01, F02 e F03.

	Acetaldeído					
	F01		F02		F03	
Tempo	Média	Variância	Média	Variância	Média	Variância
24hr	4,04	0,06	0,63	0,22	5,30	0,41
48hr	5,61	0,57	4,94	9,85	5,52	0,17
72hr	16,48	11,68	7,49	6,44	9,40	0,20
98hr	19,65	14,75	7,19	8,94	9,69	1,51
144hr	23,62	4,34	6,43	6,46	11,05	6,18
312 hr	32,83	11,08	11,48	6,81	14,30	25,04

Tabela 39. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de acetaldeído (mg/L) nos experimentos F04 e F05.

	Acetaldeído			
	F04		F05	
Tempo	Média	Variância	Média	Variância
24hr	10,93	0,45	6,93	0,29
48hr	6,92	0,22	5,64	0,47
72hr	7,58	0,64	6,73	0,26
98hr	10,23	0,54	8,87	2,61
144hr	15,67	3,23	7,66	1,40
168 hr	13,46	3,23	7,34	1,40
312 hr	27,86	75,07	14,77	4,71

Tabela 40. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de triptofol (mg/L) nos experimentos F01, F02 e F03.

	Triptofol					
	F01		F02		F03	
Tempo	Média	Variância	Média	Variância	Média	Variância
24hr	6,05	1,27	3,56	0,25	0,70	0,36
48hr	2,53	0,22	2,69	0,41	1,37	0,32
72hr	3,74	0,36	3,02	1,20	2,77	0,92
98hr	4,77	0,80	3,22	1,97	2,13	0,15
144hr	4,60	0,14	4,01	1,52	2,19	0,16
312 hr	3,06	0,53	1,22	0,41	2,76	1,83

Tabela 41. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de triptofol (mg/L) nos experimentos F04 e F05.

Tempo	Triptofol			
	F04		F05	
	Média	Variância	Média	Variância
24hr	0,00	0,00	0,00	0,00
48hr	5,14	0,91	0,02	0,00
72hr	4,60	1,65	3,53	0,21
98hr	3,70	0,66	3,11	1,63
144hr	4,40	1,01	5,30	0,75
168 hr	5,55	0,83	5,40	0,50
312 hr	5,87	1,15	5,29	0,17

Tabela 42. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de álcool fenetílico (mg/L) nos experimentos F01, F02 e F03.

Tempo	Álcool fenetílico					
	F01		F02		F03	
	Média	Variância	Média	Variância	Média	Variância
24hr	38,65	7,09	28,56	2,57	0,70	0,36
48hr	42,64	10,16	37,00	4,55	1,37	0,32
72hr	45,24	47,50	35,86	3,21	2,77	0,92
98hr	48,98	23,30	35,18	15,29	2,13	0,15
144hr	47,91	9,35	37,12	10,05	2,19	0,16
312 hr	45,71	3,56	32,46	23,73	2,76	1,83

Tabela 43. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de álcool fenetílico (mg/L) nos experimentos F04 e F05.

Tempo	Álcool fenetílico			
	F04		F05	
	Média	Variância	Média	Variância
24hr	4,76	0,11	3,94	0,03
48hr	29,89	11,77	18,10	5,14
72hr	27,91	23,13	22,70	1,99
98hr	28,15	2,76	24,43	1,15
144hr	31,77	7,62	23,52	52,29
168 hr	37,51	1,95	16,05	0,59
312 hr	37,52	4,27	26,80	38,94

Tabela 44. Valores de média e variância para a variável resposta concentração de acetato de isopentila (mg/L) nos experimentos F01, F03 e F04.

	<b>Acetato de Isopentila</b>					
	<b>F01</b>		<b>F03</b>		<b>F04</b>	
<b>Tempo</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>	<b>Média</b>	<b>Variância</b>
<b>24hr</b>	0,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>48hr</b>	1,00	0,01	0,08	0,02	0,00	0,00
<b>72hr</b>	1,12	0,01	0,33	0,00	0,00	0,52
<b>98hr</b>	1,11	0,02	0,25	0,02	0,01	0,56
<b>144hr</b>	0,63	0,02	0,14	0,02	0,00	0,41
<b>168hr</b>	-	-	-	-	0,02	0,32
<b>312 hr</b>	0,07	0,02	0,00	0,00	0,03	0,17