

Natália Joenck Ribeiro

**DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA FUNCIONAL SEM  
GLÚTEN A PARTIR DE MANDIOCA E TRIGO SARRACENO**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Engenharia de Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. Jorge Luiz Ninow.  
Co-orientador: Prof. Dr. Márcio José Rossi.

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor  
Maiores informações em:  
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

## AGRADECIMENTOS

*Aos meus pais, Márcio e Vanilda, pelo amor incondicional, incentivo aos estudos, apoio em decisões difíceis e confiança.*

*Ao meu namorado Maurício, pela cumplicidade, amor e sábios conselhos nos âmbitos pessoal e profissional.*

*Aos meus sogros, Artur e Rossane, pela constante ajuda e carinho.*

*À minha querida irmã Lígia, pelo companheirismo e compreensão.*

*Aos Professores Dr. Jorge Luiz Ninow e Dr. Márcio José Rossi, agradeço pela disponibilidade, orientação, paciência e sugestões fundamentais para este trabalho.*

*Ao professor Dr. Marcelo Maraschin, pois esteve presente desde o início, auxiliando desde o fornecimento de materiais até a própria concepção do trabalho.*

*Aos meus queridos primos, Henrique e Juliana, agradeço pelo apoio, afeição e companheirismo.*

*Aos meus grandes amigos, Jéssica e Gregório, pelos momentos de alegria e descontração.*

*Às colegas de programa, Nathália, Emanuelle e Paula, pelos grupos de estudo, discussões valiosas e amizade.*

*Ao grupo do Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal (LMBV), do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias (CCA) – UFSC, por serem tão receptivos e por sempre me auxiliarem da melhor forma no decorrer deste trabalho.*

*Ao grupo do Laboratório de Bioprocessos, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) – UFSC, pelo acolhimento e ajuda.*

*Ao grupo do Laboratório de Propriedades Físicas de Alimentos (PROFI), do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos (EQA) do Centro Tecnológico (CTC) – UFSC, pela aquisição e auxílio com a interpretação de dados importantes.*

*Agradeço à Eva Regina, Rodolfo e Claudia, pela prestatividade e apoio.*

*Aos membros da banca, pela disponibilidade e contribuições para avaliação deste trabalho.*

*À Universidade Federal de Santa Catarina, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos e a todos os professores pela oportunidade, informação e incentivo para a elaboração deste trabalho.*

*À CAPES pelo apoio financeiro.*

*E a todos que contribuíram para a realização deste trabalho.*



## RESUMO

Os alimentos funcionais oferecem benefícios à saúde, podendo desempenhar um papel benéfico na redução do risco de doenças degenerativas, como câncer e diabetes. A doença celíaca é uma doença autoimune e induzida pela ingestão de glúten. Os portadores dessa condição não podem consumir a cerveja tradicional, mas existem diversos substratos alternativos livres de glúten para a produção de cerveja. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma raiz tuberosa abundante no Brasil, razão pela qual foi uma das matérias-primas escolhidas para o projeto. O genótipo de mandioca selecionado foi o IAC 576-70, rico em  $\beta$ -caroteno, do banco de germoplasma da Epagri. A outra matéria-prima sem glúten escolhida foi o malte de trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench), um pseudocereal, fonte de aminoácidos essenciais, flavonoides e ácidos fenólicos. O amido das matérias-primas é gelatinizado no processo cervejeiro, o que possibilita a formação de amido retrogradado, que é resistente à digestão e benéfico à microbiota intestinal. Nesse contexto, foram desenvolvidas duas formulações de cerveja: a cerveja BC, elaborada com a mandioca IAC 576-70 e o malte de trigo sarraceno, e a cerveja AR, elaborada com as mesmas matérias-primas, tendo como diferença a adição extra de farinha de mandioca durante a fervura para formação de amido resistente. As cervejas apresentaram fermentação com atenuação satisfatória e um teor alcoólico que variou de 5,36-5,87% (v/v). A cerveja AR apresentou a maior turbidez, acima de 1000 FTU, devido à maior concentração de amido resistente. A concentração de FAN do mosto ficou abaixo do recomendado, mas o consumo desses compostos pela levedura foi satisfatório. As cervejas foram consideradas sem glúten ou com baixo teor de glúten e apresentaram resultado de atividade antioxidante e de concentração de fenólicos totais comparáveis aos de sucos de fruta e vinho branco. Os dados mostraram que, com um processo cervejeiro adequado, é possível a elaboração de cervejas experimentais sem glúten e com atividade antioxidante utilizando matérias-primas alternativas, e que podem ser ingeridas não só por celíacos, mas também por quem busca uma dieta mais saudável.

**Palavras-chave:** Alimentos funcionais. Carotenoides. Amido resistente. Doença celíaca. Cerveja sem glúten.



## ABSTRACT

Functional foods offer benefits to health by reducing the risk of degenerative diseases, like cancer and diabetes. The celiac disease is an autoimmune disorder induced by gluten ingestion. The celiac patients cannot consume traditional beer, but many alternative gluten-free substrates may be used in the brewing process. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is a root crop abundant in Brazil, therefore, was one of the main ingredients used in this project. The selected cassava was IAC 576-70, a genotype conserved at Epagri's genebank, rich in  $\beta$ -carotene. The other selected ingredient was malted buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench), a gluten-free pseudocereal, source of essential amino acids, flavonoids and phenolic acids. The starch present in the ingredients is gelatinized during the brewing process, forming retrograded starch, which is a resistant starch beneficial to intestinal microbiota. In this context, two functional beers were elaborated, the BC beer, brewed with cassava IAC 576-70 and malted buckwheat, and the AR beer, brewed with the same ingredients. The only difference between the two beers was an extra addition of cassava during the boiling to form resistant starch. The beers showed satisfactory degrees of attenuation and an alcohol content that ranged from 5,36 to 5,87% ABV. The AR beer presented the highest turbidity, above 1000 FTU, due to its higher resistant starch concentration. The FAN content of the wort was below than the recommended value, but the yeast consume of these components was satisfactory. The beers were considered gluten-free or with low gluten concentration and exhibited antioxidant activity and total phenolic concentration comparable to fruit juices and white wine. The data showed that, using the right process adaptations, was possible to elaborate experimental gluten-free beers with alternative substrates and that these beers can be consumed not only by the celiac patients, but also by those who seek a healthy diet.

**Keywords:** Functional foods. Carotenoids. Resistant starch. Celiac disease. Gluten-free beer.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Dependência da atividade enzimática com a temperatura e o pH, em que 0 equivale ao valor ótimo.....	27
<b>Figura 2</b> - Estrutura Química da Amilose e Amilopectina.....	33
<b>Figura 3</b> - Ação das enzimas $\alpha$ e $\beta$ -amilase em uma molécula de amido. A $\alpha$ -amilase é uma endoenzima que hidrolisa ligações $\alpha(1,4)$ e a $\beta$ -amilase é uma exoenzima que hidrolisa ligações $\alpha(1,4)$ a partir de extremidades não redutoras.....	34
<b>Figura 4</b> - Dinâmica da ação conjunta das enzimas durante a hidrólise do amido. a) Molécula de Amido. b) Ação conjunta das enzimas $\alpha$ e $\beta$ – amilase formando açúcares de alta massa molar e maltose. c) Ação da enzima $\beta$ -amilase para conversão dos açúcares em maltose. d) Açúcares formados após a hidrólise do amido.....	35
<b>Figura 5</b> - Comparação de raízes brancas de mandioca (controle) com raízes amarelas, enriquecidas em $\beta$ -caroteno.....	44
<b>Figura 6</b> - Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Enzima Termamyl SC DS® da Novozymes.....	50
<b>Figura 7</b> - Atividade vs Temperatura da Enzima Saczyme® da Novozymes em pH 4,3 (A) e Atividade vs pH da Enzima Saczyme® da Novozymes em 65 o C (B).....	50
<b>Figura 8</b> - Secagem da Farinha de Mandioca IAC-576-70.....	51
<b>Figura 9</b> – Fluxograma do processo utilizado para elaboração das cervejas padrão, AR e BC.....	57
<b>Figura 10</b> - Malte de trigo sarraceno moído.....	58
<b>Figura 11</b> - Mosturação da cerveja padrão de mandioca comum e malte de trigo sarraceno.....	58
<b>Figura 12</b> - Guia visual de cores (SRM).....	64
<b>Figura 13</b> - Padrões de Formazina de 10 a 1000 FTU.....	65
<b>Figura 14</b> - Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do genótipo de mandioca IAC-576-70.....	72
<b>Figura 15</b> - Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do Trigo Sarraceno.....	73
<b>Figura 16</b> - Comparação do perfil carotenóidico da raiz fresca (A) e da farinha (B) de mandioca IAC 576-70 obtido por CLAE 450 nm.....	75
<b>Figura 17</b> - Rampa de Temperatura aplicada na mosturação com os momentos de adição das enzimas $\alpha$ -amilase termorresistente (Termamyl SC DS ®) e $\beta$ -amilase (Saczyme ®).....	80
<b>Figura 18</b> - Perfil Médio de Fermentação da Cerveja padrão (A), Cerveja BC (B) e Cerveja AR (C).....	80

<b>Figura 19</b> - Comparação de turbidez entre as amostras da cerveja padrão (esquerda) e da cerveja AR (direita). .....	83
<b>Figura 20</b> - Concentração de FAN nas cervejas e mostos padrão, BC e AR. Valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. 84	84
<b>Figura 21</b> - Amargor das cervejas padrão, BC e AR. Valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.....	85
<b>Figura 22</b> - Concentração equivalente de ácido ascórbico (vitamina C) das amostras de cerveja padrão, BC e AR, obtida a partir da avaliação da atividade antioxidante por Inibição do radical DPPH. Valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes. Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.....	91
<b>Figura 23</b> - Concentração equivalente de ácido gálico das amostras de cerveja padrão, BC e AR, obtida a partir da avaliação de fenólicos totais. Valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey. ....	92
<b>Figura 24</b> - Concentração equivalente de quercetina das amostras de cerveja padrão, BC e AR, obtida a partir da avaliação de flavonoides totais. Valores são expressos em média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas nas colunas representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey. ....	94

## LISTA DE QUADROS

<b>Tabela 1</b> - Propriedades térmicas do trigo sarraceno e da mandioca IAC 576-70 (valores médios $\pm$ desvio padrão, n= 3 repetições) medidas por DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial) .....	71
<b>Tabela 2</b> - Umidade, densidade relativa e extrato (valores médios $\pm$ desvio padrão, n= 3 repetições) de amostras de cevada 6 RW e trigo sarraceno moídos finamente e de farinha genótipo de mandioca IAC-576-70.....	74
<b>Tabela 3</b> - Concentração média* ( $\mu\text{g/g} \pm$ desvio padrão) de carotenoides totais** e luteína, zeaxantina, cis- $\beta$ -caroteno e trans- $\beta$ -caroteno em amostras de farinha de mandioca e malte de trigo sarraceno moído, determinados por CLAE.....	76
<b>Tabela 4</b> - Eficiência de Brassagem das Cervejas Padrão, BC e AR (médias $\pm$ desvio padrão, n= 3) .....	78
<b>Tabela 5</b> - Densidade relativa dos mostos e das cervejas, teor alcoólico e extrato residual (valores médios $\pm$ desvio padrão, n = 3 repetições) de amostras de cerveja padrão, BC e AR.....	81
<b>Tabela 6</b> - Concentração média ( $\mu\text{g/mL} \pm$ desvio padrão) de luteína e zeaxantina* em amostras** de cerveja padrão, cerveja BC e cerveja AR. ....	87



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AR	Amido Resistente
ASBC	<i>American Society of Brewing Chemists</i>
BJCP	<i>Beer Judge Certification Program</i>
BU	<i>Bitterness Unit</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
RAE	<i>Retinol Activity Equivalents</i>
FAN	<i>Free Amino Nitrogen</i>
FTU	<i>Formazin Turbidity Unit</i>
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IBU	<i>International Bitterness Unit</i>
SRM	<i>Standard Reference Method</i>



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
3.1 DOENÇA CELÍACA E O GLÚTEN .....	25
3.2 ELABORAÇÃO DE CERVEJAS TRADICIONAIS E ALTERNATIVAS .....	26
3.2.1 Processo cervejeiro tradicional .....	26
3.2.2 Hidrólise do amido.....	32
3.2.3 Cervejas funcionais e alternativas .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
4.1 MATÉRIAS-PRIMAS.....	49
4.1.1 Genótipo de mandioca IAC 576-70.....	49
4.1.2 Malte e outros insumos.....	49
4.2 PREPARO INICIAL DA MANDIOCA .....	50
4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS .....	51
4.3.1 Umidade.....	51
4.3.2 Temperatura de gelatinização .....	52
4.3.3 Teor de extrato .....	52
4.3.4 Perfil carotenóidico e quantificação de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das matérias-primas e das cervejas .....	54
4.4 PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	56
4.5 ANÁLISES DO PRODUTO FINAL .....	61
4.5.1 Densidade relativa.....	61
4.5.2 Teor alcoólico .....	62
4.5.3 Extrato residual .....	63
4.5.4 Cor .....	63

4.5.5 Turbidez .....	64
4.5.6 Concentração de <i>Free Amino Nitrogen</i> (FAN) do mosto e da cerveja	65
4.5.7 Amargor .....	66
4.5.8 Glúten .....	66
4.5.9 Amido resistente .....	67
4.5.10 Atividade antioxidante e equivalência em vitamina C.....	68
4.5.11 Fenólicos totais e equivalência em ácido gálico .....	68
4.5.12 Flavonoides totais e equivalência em quercetina.....	68
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	69
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
5.1 CARACTERÍSTICAS DAS MATÉRIAS-PRIMAS.....	71
5.1.1 Temperatura de gelatinização .....	71
5.1.2 Teor de extrato.....	73
5.1.3 Teor de carotenoides da farinha de mandioca IAC 576-70.....	74
5.2. BRASSAGEM E FERMENTAÇÃO.....	78
5.3 CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO FINAL.....	81
5.3.1 Propriedades físico-químicas do mosto e das cervejas .....	81
5.3.2 Propriedades bioativas das cervejas.....	86
<b>6 CONCLUSÃO .....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>99</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>125</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais, por definição, fazem parte da dieta humana, diminuem o risco de doenças crônicas e proporcionam benefícios à saúde, além dos proporcionados por uma nutrição balanceada. Os alimentos funcionais podem ser: (i) alimentos contendo naturalmente substâncias bioativas (como a fibra alimentar), (ii) alimentos com suplemento de substâncias bioativas (como probióticos, antioxidantes...), (iii) alimentos convencionais com introdução de compostos derivados de alimentos (como prebióticos). Alimentos funcionais devem ter uma perspectiva inovadora e não têm característica de medicamento, portanto, devem fazer parte da dieta (AL-SHERAJI et al., 2013).

Em contraste com os antigos conceitos de sabor, paladar e qualidade nutricional, atualmente, a tecnologia está sendo utilizada para desenvolver produtos com diferentes atributos e muita importância tem sido dada aos benefícios funcionais e terapêuticos que um produto pode oferecer aos consumidores (JISHA et al., 2008).

A cerveja é um produto elaborado a partir de matérias-primas naturais que contém diversos aspectos benéficos à saúde. É essencialmente livre de gorduras e possui ampla gama de carboidratos, como as dextrinas, de cadeias ramificadas ou lineares, que chegam ao intestino e contribuem com fibras solúveis. A cerveja também contém aminoácidos essenciais e antioxidantes, sendo que estudos anteriores constataram mesma ordem de grandeza para a concentração de antioxidantes em cervejas, sucos, chás e vinhos (BAMFORTH, 2004). Além de ser uma fonte valiosa de vitaminas e polifenóis, também é o único alimento que contém lúpulo, uma flor cujos constituintes mais importantes são os flavonoides e a lupulina, que podem ter propriedades terapêuticas.

Nas últimas duas décadas, estudos demonstraram que o consumo de moderado de bebidas alcoólicas é benéfico à saúde (FRIEDMAN e KIMBALL, 1986; MUNTWYLER et al., 1998, LINDBERG e AMSTERDAM, 2008). O álcool atua como agente antioxidante, melhora o colesterol HDL e colabora com a coagulação sanguínea, justificando o seu efeito na redução do risco de doenças cardiovasculares (KLATSKY, 1999). Além do álcool, outros componentes da cerveja têm efeitos potencializados em uma matriz alcoólica, como os polifenóis, que também podem auxiliar na prevenção de doenças coronárias (BOOYSE et al., 2007). As cervejas, portanto, são bases promissoras para o desenvolvimento de bebidas funcionais e produtos com atividade farmacodinâmica específica (CUKALOVIC et al., 2010).

Dentre as matérias-primas existentes para o desenvolvimento de uma cerveja com efeitos positivos à saúde, algumas variedades de mandioca (*Manihot esculenta*) se destacam por possuírem compostos funcionais, como carotenoides. A mandioca é consumida por aproximadamente 500 milhões de pessoas e cultivada em mais de 102 países, devido às suas raízes ricas em amido. Atualmente, é explorada principalmente como alimento e ração animal em países tropicais e em países desenvolvidos (ONYANGO et al., 2006). O trigo sarraceno é outra matéria-prima que merece atenção ao elaborar uma cerveja bioativa. Esse pseudocereal tem sido investigado como alimento funcional, constituindo uma fonte rica em amido e outros compostos bioativos, como proteínas, substâncias antioxidantes e fibra alimentar (GIMÉNEZ-BASTIDA, PISKULA e ZIELINSKI, 2015). Adicionalmente, tanto a mandioca quanto o trigo sarraceno são livres de glúten, fração proteica responsável por uma das intolerâncias alimentares mais comuns da humanidade. Alimentos livres de glúten têm sido consumidos não só por pessoas com intolerância ao glúten, mas também como uma alternativa saudável para quem não é intolerante.

A demanda por alimentos livres de glúten não se deve somente ao aumento de pacientes celíacos diagnosticados, que tem como único tratamento a adoção e uma dieta livre de glúten, mas também à recente tendência de redução de consumo de glúten em dieta de pessoas saudáveis. Existem diferentes formas de produzir cervejas livres de glúten, mas a utilização de matérias-primas alternativas permite uma avaliação mais profunda da bioatividade da cerveja, que nesse caso se deu com a exploração de um genótipo de mandioca enriquecido em  $\beta$ -caroteno. Tendo isso em vista, o interesse em desenvolver alimentos livres de glúten saudáveis e saborosos, utilizando tecnologias atuais, é justificado.

A presente proposta, portanto, visa o desenvolvimento de cervejas com características bioativas, advindas de um genótipo de mandioca com polpa pigmentada, rico em carotenoides, e do trigo sarraceno, rico em fenólicos com propriedades antioxidantes. A cerveja elaborada poderá ser apreciada pelo público portador da doença celíaca por ser livre de glúten e por todos como fonte de nutrientes.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Elaboração de cervejas sem glúten e com características funcionais, utilizando malte de trigo sarraceno e uma variedade de mandioca enriquecida em carotenoides. As cervejas devem apresentar atividade antioxidante, fenólicos, amido resistente e carotenoides em concentrações que contribuam com a ingestão diária recomendada desses compostos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as matérias-primas quanto ao teor de extrato, FAN (*Free Amino Nitrogen*), temperatura de gelatinização e concentração de carotenoides para planejamento e adequação do processo cervejeiro.
- b) Produzir hidrolisados a partir da mandioca e do trigo sarraceno utilizando enzimas comerciais, que apresentem liquefação e conversão satisfatória de amido em açúcares fermentáveis.
- c) Desenvolver uma metodologia para produção de cervejas sem glúten utilizando fécula de mandioca e trigo sarraceno.
- d) Avaliar os produtos finais quanto à sua qualidade por medidas de pH, extrato residual, FAN, turbidez, cor, amargor, álcool e densidade relativa e compará-lo com valores médios de cervejas semelhantes e cervejas de cevada.
- e) Avaliar os produtos finais quanto aos compostos funcionais carotenoides, amido resistente, glúten, fenólicos totais, atividade antioxidante e flavonoides e compará-los com cerveja feita com farinha de mandioca comum e outros alimentos.



### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 DOENÇA CELÍACA E O GLÚTEN

A crescente demanda por alimentos livres de glúten é consequência do recente aumento de pacientes diagnosticados, que devem consumir exclusivamente esses alimentos. Doenças em que a eliminação do glúten resultou em aumento de qualidade de vida, acabaram por lançar uma tendência de eliminá-lo também da dieta de pessoas saudáveis (WITCZAK et al., *in press*). O mercado de produtos livres de glúten moveu 1,31 bilhões de dólares em 2011 e tem projeção de aumentar para 1,68 bilhões de dólares em 2015 nos Estados Unidos (NIJEBOER et al., 2013). No Reino Unido, entre 2012 e 2013, o mercado cresceu em 23% (THOMAS, 2013). Estima-se que o mercado global movimentará 6,2 bilhões de dólares em 2018 (WITCZAK et al., *in press*).

A determinação de um padrão internacional para definir alimentos livres de glúten foi realizada pelo *Codex Alimentarius*, que determinou que esses alimentos não podem conter trigo, centeio, cevada, aveia ou suas variedades, a não ser que esses cereais sejam submetidos a tratamentos com finalidade de reduzir a concentração de glúten para valores inferiores a 20 ppm (CODEX ALIMENTARIUS, 2008).

O glúten atraiu muita atenção nas últimas décadas devido ao crescente número de pacientes diagnosticados com intolerância a essa fração proteica, fato que está relacionado com a melhora da sensibilidade dos métodos de detecção e à disseminação de dados sobre a doença. Três patologias estão associadas com o consumo de glúten: 1) Alergia ao trigo; 2) Doença celíaca, que é uma patologia autoimune causada pela ingestão de glúten de diferentes origens, não só do trigo; 3) Sensibilidade ao glúten, que não é alergia ou disfunção autoimune (ROSELL et al., 2014).

O glúten faz parte das frações de armazenagem de proteína no endosperma de grãos como trigo, cevada e centeio. Essas frações são classificadas em quatro classes, dependendo da sua solubilidade: albuminas, globulinas, prolaminas e gluteninas. As prolaminas são cadeias polipeptídicas monoméricas, ricas em prolina e glutamina. As prolaminas do trigo são conhecidas como gliadinas, da cevada como hordeínas e do centeio como secalinas. Esses compostos são popularmente conhecidos como glúten e são os principais responsáveis pelos sintomas da doença celíaca (FSAI, 2008).

A doença celíaca é uma condição crônica, autoimune e induzida pela ingestão de glúten, que se manifesta por diversos sintomas em pessoas geneticamente predispostas. A ocorrência dessa condição foi

estimada em 1 a cada 100 pessoas, o que faz dela uma das intolerâncias alimentares mais comuns existentes (DIELI-CRIMI et al., 2015). A reação imunológica aos grãos de trigo, cevada e centeio, desencadeia um estado inflamatório na mucosa duodenal dos pacientes. Em pessoas geneticamente susceptíveis, o glúten é insuficientemente degradado pelas enzimas gastrointestinais, permeando o tecido linfático e ligando-se a células com antígeno celíaco-específico, que estimulam as células T intestinais, causando inflamação (ROSELL et al., 2014).

O papel crítico do glúten foi comprovado pelo fato de que pessoas portadoras da doença celíaca que adotaram uma dieta livre de glúten deixaram de apresentar sintomas (TONUTTI et al., 2014), sendo que a adesão a essa dieta é o único tratamento existente atualmente (PHIARAIIS e ARENDT, 2008; ROSELL et al., 2014; DIELI-CRIMI et al., 2015). A cerveja, por exemplo, que tem como grão base a cevada ou o trigo, não é permitida para os pacientes com essa condição. Os alimentos recomendados incluem: batata, milho, arroz, mandioca, trigo sarraceno, entre outros grãos e cereais (PHIARAIIS e ARENDT, 2008).

Justifica-se, portanto, o atual interesse em desenvolver alimentos livres de glúten que sejam seguros, saudáveis e saborosos, desafio que vem sendo superado com o uso de tecnologias inovadoras.

## 3.2 ELABORAÇÃO DE CERVEJAS TRADICIONAIS E ALTERNATIVAS

### 3.2.1 Processo cervejeiro tradicional

O processo tradicional de fabricação de cervejas passa por diversas etapas e cada uma pode ser realizada de diferentes maneiras. O conhecimento profundo de cada etapa é importante para evitar problemas nas etapas subsequentes, conferir características específicas à cerveja, corrigir possíveis limitações da matéria-prima, adaptar o processo para diferentes realidades, evitar aromas e sabores indesejados no produto final, etc. Tendo isso em vista, cada etapa do processo, e seu impacto no produto final, é brevemente descrita a seguir:

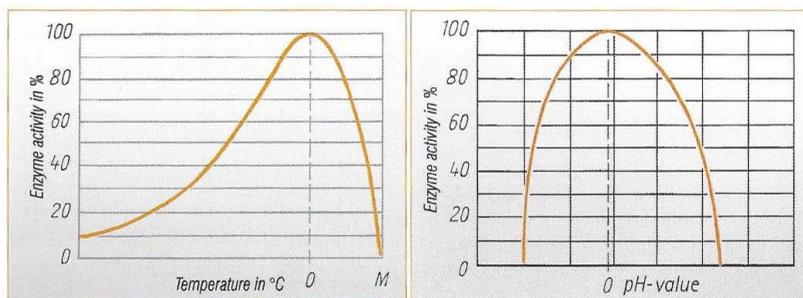
- *Moagem*: O processo cervejeiro inicia com a quebra de grãos da matéria-prima, com o principal objetivo de permitir a entrada de água seguida da gelatinização, possibilitando assim, a ação das enzimas amilolíticas durante a mosturação. Quando o grão moído possui cascas, as mesmas devem ser quebradas o mínimo possível, para auxiliar na filtragem/clarificação do mosto, mas a moagem não deve ser intensa a

ponto do tamanho de partícula prejudicar a clarificação, resultando em alta perda de carga (ASANTE, 2008).

- *Mosturação*: É a etapa mais importante da fabricação do mosto. Essa operação envolve a adição de água a alta temperatura (66-72 °C) ao grão moído empregando leve agitação, com a finalidade de fazer a extração dos componentes do malte e a degradação enzimática do amido em açúcares fermentáveis (KUNZE, 2010). Esse estágio requer cuidado no controle da temperatura e do pH para garantir a atividade ideal das enzimas do malte.

Na Figura 1 estão os diagramas de dependência de pH e temperatura das enzimas amilolíticas mais importantes do malte, a  $\alpha$ -amilase e a  $\beta$ -amilase, sendo que a temperatura ótima é de 70-74 °C e de 62 °C para a  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase respectivamente, e o pH ótimo é de 5,6-5,8 e 5,4-5,5 para a  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase respectivamente (KUNZE, 2010).

Figura 1 - Dependência da atividade enzimática com a temperatura e o pH, em que 0 equivale ao valor ótimo.



Fonte: KUNZE, 2010.

A temperatura da mosturação varia conforme o perfil de cerveja desejado, uma vez que existem diversas enzimas no malte, com diferentes funções e temperaturas ideais. Além das enzimas amilolíticas, existem as enzimas que atuam sobre lipídeos, importantes para características sensoriais específicas da cerveja, as endo- $\beta$ -glucanases e exo- $\beta$ -glucanases, que participam da quebra de paredes celulares, as endopeptidases e carboxipeptidases, que estão envolvidas nas reações proteicas, entre diversas outras (BAMFORTH, 2009).

Durante a etapa de mosturação é importante a degradação: de  $\beta$ -glucanos, que aumentam viscosidade e causam problemas de filtração; proteínas, cujos produtos de degradação proteica de baixo peso molecular contribuem para a nutrição da levedura e os produtos de alto peso molecular contribuem para a turbidez, estabilidade de espuma e corpo; ácidos graxos, que mesmo em pequenas quantidades, quando insaturados, são um risco para a estabilidade de sabor devido à oxidação. Assim como a degradação, a dissolução de certos compostos é importante nessa etapa, como os polifenóis, advindos da casca e do endosperma do grão, responsáveis pela proteção da oxidação e pelo aumento da atividade antioxidante. Extrato é o nome dado para todos os componentes solúveis em água, já presentes nas matérias-primas ou formados durante a mosturação, que pode ser determinado medindo a densidade do mosto (ANNEMÜLLER e MANGER, 2013). Essas substâncias incluem açúcares, dextrinas, substâncias inorgânicas, proteínas e outras (KUNZE, 2010). O conhecimento do extrato das matérias-primas é de fundamental importância na elaboração de uma cerveja, especialmente para estimar parâmetros como a densidade do mosto e teor alcoólico.

O processo de mosturação é classificado em dois tipos: infusão e decocção. O método de infusão, todo o mosto é aquecido, com as rampas apropriadas, e nenhuma parte do mosto é removida para ser fervida separadamente. Na decocção, a temperatura é aumentada removendo parte do mosto, fervendo-a e bombeando-a de volta, conforme a rampa adotada. Esse processo pode ser repetido diversas vezes (KUNZE, 2010).

- *Clarificação*: O principal objetivo dessa etapa é separar o mosto dos grãos e filtrá-lo. Após a mosturação, o mosto é transferido para um tanque de fundo falso, que retém os grãos e permite a passagem do mosto clarificado para a próxima etapa. Os grãos exauridos e suas cascas auxiliam no processo de filtragem do mosto, sendo que o mesmo é recirculado no tanque até ficar límpido. O primeiro mosto é bombeado para o tanque de fervura até o leito de grãos ficar visível, que é quando se inicia a aspersão. A aspersão consiste em adicionar água quente (aprox. 75 °C) aos grãos, a fim de se obter maior extrato, e pode ser feita de forma contínua ou em etapas (KUNZE, 2010). A água de aspersão é bombeada para o tanque de fervura, junto ao primeiro mosto, restando na tina de clarificação apenas o grão exaurido.

- *Fervura*: Lewis e Young (1995) descreveram a fervura como a estabilização do mosto, devido às altas temperaturas aplicadas, que reduz a carga microbiana. A esterilização do mosto, no entanto, é apenas um

dos efeitos relevantes da fervura. Durante essa etapa, o lúpulo é adicionado e ácidos insolúveis são extraídos e convertidos em iso-alfa-ácidos, com solubilidade maior, sendo que a reação é acelerada com o aumento de temperatura. A isomerização é relativamente rápida e produz cerca de 90% do amargor do mosto, nos primeiros 30 minutos de fervura. Normalmente, a máxima isomerização ocorre de 60 a 70 minutos de fervura (ASANTE, 2008).

Compostos voláteis indesejados são liberados durante a evaporação do mosto, sendo que o principal é o dimetil sulfeto (DMS), que confere sabor e aroma de milho em conserva. Esse composto é oriundo de maltes pilsen e é produzido pela decomposição térmica de S-metil-metionina (O'ROURKE, 2002). A intensidade da cor aumenta durante a fervura, devido a reações entre compostos amínicos e carbonílicos (reações de Maillard), caramelização de açúcares e oxidação de polifenóis (O'ROURKE, 2002). Resumidamente, Hough (1985), delineou os principais efeitos da fervura do mosto:

- Esterilização do mosto
- Finalização da ação enzimática
- Concentração do mosto
- Isomerização das substâncias amargas
- Remoção de voláteis indesejados
- Aumento da intensidade da cor
- Redução de pH
- Redução de Nitrogênio
- Extração e precipitação de taninos
- Produção de componentes redutores

Após a fervura, deve-se separar o mosto dos detritos de lúpulo, proteínas coaguladas e outras impurezas do malte, conhecidos como *triüb*. Quando não separado, o *triüb* pode prejudicar a fermentação. Atualmente, cervejarias utilizam um tanque para *whirlpool*, que pode ser o próprio tanque de fervura com uma entrada tangencial, em que o mosto entra em alta velocidade. O movimento giratório acelera as partículas de *triüb* para o centro do tanque, formando um cone de *triüb*. O mosto é então bombeado para fora do tanque em pontos estratégicos, de forma a não perturbar o cone (ASANTE, 2008).

- *Resfriamento*: O objetivo dessa operação unitária é trazer a temperatura do mosto fervido até a temperatura de fermentação, que varia conforme o

tipo de cerveja e levedura utilizada. Em seguida ocorre a oxigenação do mosto e adição de levedura. A levedura necessita de oxigênio para replicar-se e sintetizar suas paredes celulares, portanto, mostos pouco aerados resultarão em baixo crescimento da levedura e fermentações lentas. O teor ideal de oxigênio (aprox. 8 ppm) é importante especialmente no início da fermentação, e uma vez suficiente, não é necessária nova aeração, uma vez que condições anaeróbias devem ser estabelecidas e são necessárias para prevenir reações de oxidação que prejudicam o produto final (LEWIS e YOUNG, 1995).

- *Fermentação*: Segundo Asante (2008), a levedura cresce e se multiplica, gerando novas gerações de leveduras para fermentações futuras, sendo que os produtos secundários desse processo contribuem majoritariamente para a composição química da cerveja (álcool, CO<sub>2</sub> e diversos outros componentes que conferem sabores e aromas).

Para conduzir os processos metabólicos necessários para a vida e produção de novas células, a levedura necessita de substrato e energia. Muita energia é adquirida pela respiração, uma vez que a glicose é convertida totalmente em água e gás carbônico, que estão em último na escala energética, ou seja, não se pode obter mais energia pela quebra desses compostos. Quando não há oxigênio, a levedura, em presença de açúcar, realiza a fermentação alcoólica para adquirir energia. O álcool formado ainda contém muita energia, portanto, durante a fermentação, a energia adquirida é consideravelmente menor que durante a respiração (KUNZE, 2010).

A célula de levedura possui rotas metabólicas para carboidratos, nitrogênio, gordura e substâncias inorgânicas. O metabolismo dos carboidratos tem a principal finalidade de produzir energia durante a respiração e fermentação, que é utilizada para formação de novas células, assimilação de substâncias, quebra e excreção de compostos nocivos e transporte de substâncias para a célula. O metabolismo de nitrogênio, gordura e inorgânicos têm a função de renovar substâncias celulares.

A levedura necessita principalmente, dentre os minerais, de fósforo e enxofre, além de diversos íons metálicos em pequenas quantidades, que participam do metabolismo de inorgânicos. O fósforo é fundamental para formação de ATPs, de membranas celulares e para evitar grandes variações de pH, o enxofre é incorporado no metabolismo de aminoácidos (KUNZE, 2010).

Antes da fermentação, a aeração do mosto é necessária para garantir um crescimento satisfatório da levedura e uma boa performance posterior na fermentação (DEPRAETERE et al., 2008), obtidos pela

respiração. As células de levedura possuem esteróis e ácidos graxos insaturados em quantidades insuficientes no início da fermentação, e o crescimento só tem início quando níveis apropriados desses componentes da membrana são sintetizados (DAVID e KIRSOP, 1973) durante o metabolismo de lipídeos. O oxigênio é essencial para a biossíntese dos ácidos graxos insaturados e ergosterol, portanto, o mosto deve ser inevitavelmente exposto a altas concentrações de oxigênio (~8 mg/L) no início da fermentação (DEPRAETERE et al., 2008).

A levedura é composta de 35 a 60% (massa seca) por proteínas, portanto, para produção de novas células, são necessárias diversas fontes de nitrogênio, que estão presentes no mosto cervejeiro em forma de aminoácidos. O metabolismo proteico é de suma importância, uma vez que muitos metabólitos produzidos ficam na cerveja, alterando a estabilidade, o sabor, e em particular, a retenção de espuma. Deve-se evitar a excreção da proteinase A, uma protease, causada por condições de estresse (alto teor alcoólico, alta pressão, suprimento insuficiente de nutrientes, alta pressão osmótica...), pois essa enzima quebra proteínas transportadoras de lipídeos, que são fundamentais para a estabilidade de espuma, além de aumentar a autólise celular (KUNZE, 2010). Ao fim da fermentação deve-se remover as leveduras. A levedura agrega-se naturalmente, formando uma massa concentrada no tanque de fermentação, que é facilmente retirada pelo fundo.

- *Maturação*: O processo tradicional de maturação está ligado às cervejas *lagers* de origem alemã, em que a cerveja não maturada é submetida à temperatura de 6 - 8 °C por um dia e depois à 0-2 °C por semanas ou até meses. A levedura tem um importante papel nessa etapa, uma vez que a cerveja recém fermentada contém altos níveis de compostos com sabores indesejados, como diacetil e acetaldeído. Portanto, um período de maturação a temperaturas mais altas (6-8 °C) permite que a levedura ainda em suspensão, não retirada após a fermentação, quebre esses compostos. Além disso, a levedura consome possíveis resquícios de oxigênio e confere sabores mais refinados devido a uma segunda fermentação mais lenta. A etapa da maturação a temperaturas mais baixas (0-2 °C) permite a precipitação de componentes proteicos e polifenóis, causadores de turbidez, e a clarificação da cerveja, devido à sedimentação de leveduras e outros compostos suspensos (DEECOM & ASSOCIATES, 2015).

- *Envase*: A cerveja pode ser envasada em garrafas de vidro (retornáveis ou não), garrafas de plástico (retornáveis ou não), em cascos, barris, latas e outros. A principal preocupação dessa etapa é a entrada de oxigênio, que

causa oxidação da cerveja, adicionando aromas e sabores indesejados (KUNZE, 2010).

A cerveja pode ser envasada em garrafa por contrapressão ou açúcar *priming*. O primeiro sistema exige que a cerveja a ser envasada esteja gelada e gaseificada, o que pode ser obtido por controle da pressão durante a maturação. Como nesse sistema a cerveja fresca já está gaseificada, uma contrapressão de CO<sub>2</sub> deve ser aplicada para evitar perda de gás e penetração de oxigênio no produto (KUNZE, 2010). O segundo sistema consiste em adicionar levedura, ou aproveitar a levedura em suspensão, e uma quantidade calculada de açúcar fermentável à garrafa, que passa novamente por fermentação e maturação. A levedura consome o açúcar adicionado, gerando CO<sub>2</sub> e gaseificando a cerveja na garrafa.

### 3.2.2 Hidrólise do amido

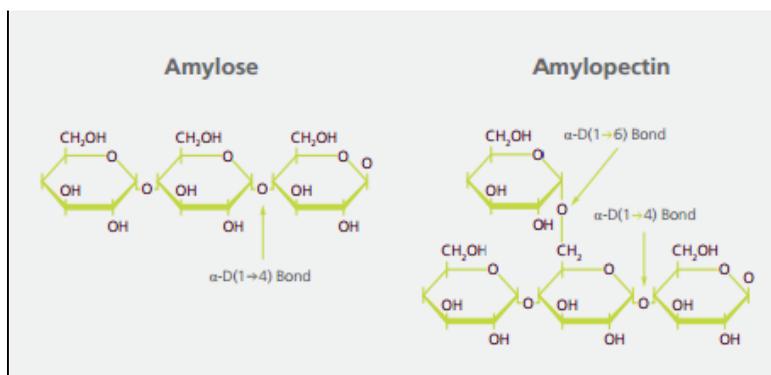
Amido de diversas origens pode ser utilizado como matéria-prima na fabricação de cerveja, não só do trigo e cevada. Deve-se observar, no entanto, que a utilização de matérias-primas diferentes normalmente exige que a hidrólise do amido seja feita utilizando enzimas comerciais, uma vez que, normalmente, a temperatura de gelatinização dessas matérias-primas está acima do ponto ótimo das enzimas amilolíticas que possam existir nas mesmas. Portanto, as rampas de temperatura na mosturação devem ser selecionadas com muito critério, já que o amido deve ser gelatinizado ao mesmo tempo que as enzimas não podem ser desativadas (KISS, 2011). A origem, dosagem, temperatura, pH e o tempo de ação das enzimas responsáveis pela liquefação e sacarificação, são importantes para a composição final do hidrolisado (CEREDA e VILPOUX, 2003).

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria. Quando o amido é aquecido em presença de água, os grânulos absorvem água e incham. A absorção de água, pela região amorfa nos grânulos, desestabiliza sua estrutura cristalina, o que resulta na gelatinização, que é a passagem do amido para a fase líquida. No processo cervejeiro, a liquefação ocorre após a gelatinização, quebrando o amido em maltodextrinas (oligo e polissacarídeos) e promovendo a redução da viscosidade do meio. Em seguida ocorre a sacarificação, que é realizada com enzimas específicas, dependendo do hidrolisado desejado (CEREDA, 2013). Todo esse processo, desde a gelatinização até a sacarificação, é conhecido como hidrólise do amido, fundamental na fabricação de cervejas, ocorrendo na etapa de mosturação.

É importante o conhecimento da razão amilose/amilopectina do amido do grão/cereal que será hidrolisado, para ajuste da etapa de mosturação, uma vez que a viscosidade e a absorção de água no mosto dependem disso. A proporção amilose-amilopectina é influenciada pela maturidade, variedade, origem e espécie de planta. Essas variações podem resultar em grânulos de amido com propriedades físico-químicas e funcionais diferenciadas, o que influencia na sua aplicação em alimentos (WALTER et al., 2005). Um amido com alto teor de amilose, por exemplo, possui uma alta resistência à gelatinização e hidrólise (MAN et al., 2012), o que não é desejável para produção de hidrolisados. A razão amilose/amilopectina do trigo sarraceno, por exemplo, é a que mais se aproxima da razão amilose/amilopectina da cevada, se comparada com a do arroz e milho (KISS, 2011). O amido da cevada é composto, em média, por 22% de amilose e 78% de amilopectina (ANNEMÜLLER e MANGER, 2013), o da mandioca por 17% de amilose e 83% de amilopectina (MONTAGNAC et al., 2009) e o do trigo sarraceno por 24% de amilose e 76% de amilopectina (GAO et al., 2016).

A amilose é formada por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas  $\alpha(1-4)$ , originando uma cadeia linear. A amilopectina é formada por unidades de glicose unidas em  $\alpha(1-4)$  e  $\alpha(1-6)$ , formando uma estrutura ramificada, como pode ser visualizado na Figura 2.

Figura 2 - Estrutura Química da Amilose e Amilopectina.

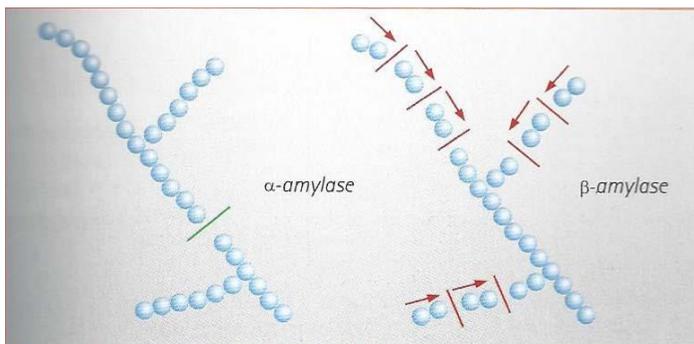


Fonte: NOVOZYMES, 2013.

As principais enzimas que participam da hidrólise do amido são:  $\beta$ -amilase,  $\alpha$ -amilase, dextrinase limite e glucoamilase. Essas enzimas amilolíticas são classificadas conforme sua função ou mecanismo de

ação. A  $\alpha$ -amilase é uma endoenzima, que catalisa a hidrólise de ligações  $\alpha(1-4)$  do amido, mas não catalisa a hidrólise de ligações  $\alpha(1-6)$ . Essa enzima transforma do amido em  $\alpha$ -dextrinas de alta massa molar e tem a característica de ser liquidificante, ou seja, reduz significativamente a viscosidade de pastas gelificadas de amido. A  $\beta$ -amilase é uma exoenzima que catalisa especificamente a hidrólise das ligações  $\alpha(1-4)$  do amido a partir de uma extremidade não redutora, produzindo apenas maltose com uma extremidade redutora. A  $\beta$ -amilase é considerada uma enzima sacarificante, uma vez que produz açúcares a partir do amido. A ação conjunta da  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase sobre a amilopectina produz dextrinas limite, cujas ligações  $\alpha(1-6)$  são hidrolisadas pela dextrinase limite, uma vez que as  $\alpha$  e  $\beta$ -amilases não hidrolisam ligações  $\alpha(1-6)$ . A glucoamilase é uma enzima liquidificante e sacarificante, que hidrolisa completamente o amido em glicose a partir de uma extremidade não redutora, e é a única capaz de hidrolisar ao mesmo tempo ligações  $\alpha(1-4)$  e  $\alpha(1-6)$ . O resultado da ação dessas enzimas no amido é a transformação total do mesmo em unidades de glicose, maltose, maltoriose e dextrinas limite, conforme pode ser visualizado nas Figuras 3 e 4.

Figura 3 - Ação das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase em uma molécula de amido. A  $\alpha$ -amilase é uma endoenzima que hidrolisa ligações  $\alpha(1,4)$  e a  $\beta$ -amilase é uma exoenzima que hidrolisa ligações  $\alpha(1,4)$  a partir de extremidades não redutoras.

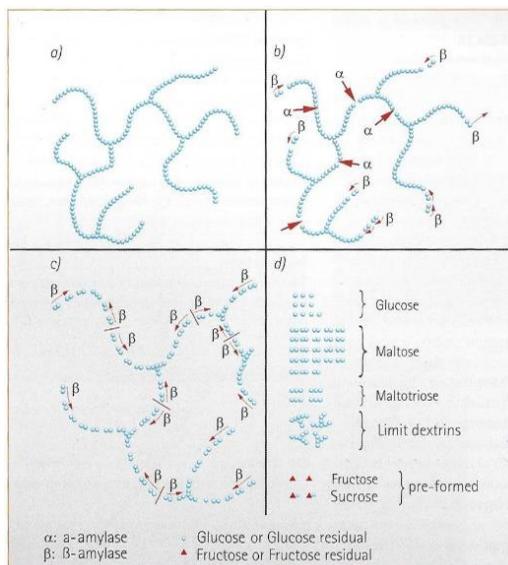


Fonte: KUNZE, 2010.

A Figura 3 mostra a ação conjunta das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase durante a hidrólise do amido, em que a  $\alpha$ -amilase quebra as ligações  $\alpha(1,4)$  a partir do meio da molécula de amido, característica de uma endoenzima, e a  $\beta$ -amilase quebra as ligações  $\alpha(1,4)$  a partir das extremidades da molécula, característica de exoenzima. A Figura 4

mostra, de forma geral, as etapas da hidrólise do amido, iniciando com a dinâmica de ação da  $\alpha$  e  $\beta$ -amilase (b), que formam açúcares de alto peso molecular e maltose, seguida da ação da  $\beta$ -amilase, que completa a sacarificação a partir das extremidades não redutoras dos açúcares de alto peso molecular formados pela  $\alpha$ -amilase, transformando-os em maltose (c), e os açúcares que são formados ou mantidos ao final da hidrólise (d).

Figura 4 - Dinâmica da ação conjunta das enzimas durante a hidrólise do amido. a) Molécula de Amido. b) Ação conjunta das enzimas  $\alpha$  e  $\beta$  – amilase formando açúcares de alta massa molar e maltose. c) Ação da enzima  $\beta$ -amilase para conversão dos açúcares em maltose. d) Açúcares formados após a hidrólise do amido.



Fonte: KUNZE, 2010.

No processo clássico de produção de cerveja, as enzimas do próprio malte, durante a etapa denominada mosturação, hidrolisam o amido para transformá-lo em açúcares fermentescíveis. Isso é possível devido ao fato de que a temperatura da mosturação (63 – 72 °C) coincide com a temperatura ótima de atuação das amilases presentes na cevada maltada e também com a temperatura de gelatinização do amido, portanto, além de estarem em uma condição favorável, as enzimas estarão atuando em um amido completamente gelatinizado.

### 3.2.3 Cervejas funcionais e alternativas

Pesquisas envolvendo bebidas funcionais já foram realizadas com trigo sarraceno, utilizando esse grão como base, juntamente com sucos de frutas e probióticos clinicamente comprovados (BAMFORTH, 2006). Estudo de Cukalovic et al. (2010) envolveu a adição do fungo *Ganoderma lucidum* em cervejas comerciais do tipo Pilsen, visando a produção de uma cerveja com boas características sensoriais e bioativas. Acredita-se que esse fungo diminua o risco de câncer, melhore o sistema imunológico e evite doenças do coração e do fígado. Uma cerveja tipo *Pilsen*, com propriedades funcionais devido à adição da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*, foi elaborada por Reitenbach (2010). Os probióticos são conhecidos por melhorar o estado da microbiota intestinal, o sistema imunológico e a digestão.

Apesar de existirem alguns estudos sobre cervejas bioativas, eles são escassos, e não existe enfoque no potencial bioativo de uma cerveja com mandioca, apesar da mandioca já ter sido explorada anteriormente como adjunto cervejeiro (VENTURINI FILHO e CEREDA, 1998; ASANTE, 2008; MANDANNA et al., 2012). Alimentos funcionais e cervejas sem glúten, por outro lado, são tendências, e existe uma variedade de pesquisas que avaliam propriedades de grãos alternativos sem glúten e a retenção de compostos bioativos nos alimentos.

A cerveja é um produto elaborado com matérias-primas naturais, que contém matérias-primas benéficas à saúde, e pode ser uma fonte valiosa de diversas vitaminas solúveis e polifenóis. Cervejas funcionais, portanto, caracterizam uma base promissora para o desenvolvimento de uma ampla variedade de bebidas e produtos, voltados aos públicos com diferentes necessidades em suas dietas.

#### 3.2.3.1 Cervejas livres de glúten

A introdução da lei da pureza alemã, estabelecida em 1516, definiu que a cerveja não poderia ser produzida com um grão diferente da cevada. Atualmente, no entanto, sabe-se que existem diversos substratos alternativos para a produção de cerveja, e, para suprir as necessidades dos portadores da doença celíaca, outros cereais (arroz e milho) e pseudocereais (trigo sarraceno, quinoa e amaranto) têm sido investigados. Especial atenção tem sido dada a esses substratos não só devido à ausência de glúten, mas também pela presença de compostos que tem efeitos positivos à saúde (PHIARAIS e ARENDT, 2008).

Recentemente, cervejeiros tradicionais evitam a utilização de adjuntos, visando a produção de cervejas *premium* ou “puro malte”, convencidos da qualidade de seu produto. No entanto, há uma justificativa plausível para o uso de adjuntos, uma vez que esses oferecem produtos únicos no quesito cor e sabor. As cervejas líderes mundiais em qualidade apresentam diferentes adjuntos na sua formulação (BAMFORTH, 2006). Além disso, adjuntos podem fornecer características funcionais e nutricionais que as matérias-primas tradicionais não podem.

A fabricação de cerveja sem glúten exige algumas mudanças do processo clássico. As estratégias atualmente disponíveis para a produção de uma cerveja para celíacos são (LANDSCHOOT, 2011): eliminação de proteínas relevantes das matérias-primas tradicionais (maltes de cevada e trigo) por pré-tratamento ou durante a maltagem e mosturação; utilização de grãos, pseudocereais e tubérculos, naturalmente livres de glúten, como matéria-prima substituta do malte de cevada, trigo ou centeio; e o desenvolvimento de cervejas derivadas de materiais que não contém proteínas, como xaropes de açúcares fermentados.

Existem diversas matérias-primas alternativas que podem ser utilizadas para elaboração de uma cerveja funcional sem glúten como o arroz, milho, sorgo, trigo sarraceno, mandioca, batata, quinoa, amaranto, etc. No entanto, quando essas matérias-primas alternativas são utilizadas, deve-se observar que, além dos açúcares fermentáveis advindos do amido, outros componentes são importantes para o crescimento saudável da levedura, como os FAN (*Free Amino Nitrogen*), que são compostos nitrogenados assimiláveis pela levedura (aminoácidos livres, íons de amônio, dipeptídeos e tripeptídeos), oxigênio, vitaminas, íons de fósforo, enxofre, cálcio e magnésio, além de elementos traço, como íons de cobre e zinco (LEWIS e YOUNG, 1995). É de amplo conhecimento que o malte de cevada possui esses elementos em quantidade suficiente para uma fermentação saudável, no entanto, adjuntos inovadores podem ser deficientes em algum nutriente, o que pode vir a prejudicar a fermentação. Os FAN, por exemplo, merecem atenção especial, uma vez que a deficiência de nitrogênio tem sido identificada como uma das principais causas de fermentações presas ou lentas. Além disso, o nitrogênio regula a formação de subprodutos e produtos finais (CONTRERAS et al., 2013). Portanto, ao elaborar uma cerveja com matérias-primas alternativas, deve-se estudar a composição química de cada ingrediente e estar preparado para fazer os ajustes necessários para garantir que a fermentação ocorra normalmente.

### 3.2.3.2 Influência do processamento na retenção de compostos bioativos no produto final

Diversos estudos (CEBALLOS et al., 2012; ENGLYST et al., 1992; GOÑI et al., 1996; HEDREN, 2002; LIVNY et al., 2003; MUIR & O'DEA, 1992; THAKKAR et al., 2009; WALTER et al., 2005) constataram que o processamento tem grande influência na concentração de compostos bioativos, como amido resistente, carotenoides, fenólicos e outros antioxidantes.

O cozimento colabora com a formação de amido resistente. Foi constatado, em pesquisa anterior, que amidos isolados de legumes cozidos se mostraram mais ricos em amido resistente do que o material cru. Além disso, observou-se que a moagem e o armazenamento em baixas temperaturas também favorecem a existência de amido resistente no alimento. A fermentação, por outro lado, aparentemente reduz a concentração desse composto bioativo (SAJILATA et al., 2006).

O termo “amido resistente” surgiu em 1982 para descrever uma pequena fração do amido que resiste à hidrólise por mais de 120 minutos em tratamento *in vitro* utilizando  $\alpha$ -amilase e pululanase (SAJILATA et al., 2006), portanto, o amido resistente tem a característica de resistir à hidrólise enzimática no intestino e passar direto ao cólon. Ele atua como substrato para os microrganismos probióticos presentes no intestino, portanto, possui atividade prebiótica. Os produtos da fermentação, que consistem em pequenas cadeias de ácidos graxos e biomassa, podem ser parcialmente absorvidos para fornecer energia às células da mucosa ou fornecer suporte ao crescimento e metabolismo da microbiota intestinal. Estudos nutricionais mostraram que o amido resistente melhora o metabolismo lipídico e o metabolismo do colesterol, reduz o risco de úlceras, câncer colorretal, doença cardíaca coronária, constipação e diabetes tipo II (JENKINS et al., 1988; READER et al., 1997; FERGUSON et al., 2000; HIGGINS et al., 2004).

O amido resistente pode ser classificado em amido fisicamente impedido (AR1), grânulos de amido resistente (AR2), amido retrogradado (AR3) e amido obtido por tratamento químico (AR4) (WALTER et al., 2005; SAJILATA et al., 2006). A forma física do alimento pode impedir o acesso da amilase pancreática e diminuir a digestão do amido, fato que caracteriza o amido resistente tipo AR1. A forma do grânulo influencia na sua digestão, caracterizando o amido resistente tipo AR2. A maioria do amido ingerido pelo homem é submetida a tratamentos com calor e umidade, resultando no rompimento e gelatinização da estrutura do grânulo. Quando o gel esfria, o amido gelatinizado forma novamente uma

estrutura parcialmente cristalina, insolúvel e resistente à digestão enzimática. Este processo é denominado retrogradação, caracterizando o amido resistente tipo AR3. O amido resistente tipo AR4 contém ligações diferentes de  $\alpha$  (1-4) e  $\alpha$  (1-6), obtidas por tratamentos químicos. Nesse contexto, conclui-se que alimentos crus e processados possuem quantidades apreciáveis de amido resistente, dependendo da fonte botânica e do tipo de processamento, como moagem, cozimento e resfriamento (ENGLYST et al., 1992; MUIR & O'DEA, 1992; GOÑI et al., 1996; SAJILATA et al., 2006).

O amido resistente pode ser utilizado em líquidos espessos, ficando em suspensão e deixando o meio opaco. Comparado com fibras insolúveis, o amido resistente confere uma textura menos pastosa e menos sabor ao líquido (SAJILATA et al., 2006). Isso leva a crer que é possível criar uma cerveja com amido resistente do tipo AR3, desde que a fonte de amido seja adicionada durante a fervura, passando por cozimento seguido de resfriamento, para que ocorra a gelatinização e retrogradação do amido.

A biodisponibilidade de carotenoides depende de vários fatores, incluindo suas propriedades físico-químicas, matriz alimentícia (teores de lipídeos, fibras, etc.), método de processamento, status nutricional e saúde geral do indivíduo. O tratamento térmico e a presença de lipídeos em uma matriz alimentícia mostraram-se benéficos para a biodisponibilidade e isomerização cis-trans do  $\beta$ -caroteno, já que carotenoides são lipofílicos e o calor pode induzir a isomerização. Isso indica que esse componente pode permanecer nos alimentos, mesmo após o cozimento, comum no seu processamento. No entanto, é essencial entender os mecanismos de degradação dos carotenoides, para desenvolver estratégias para melhorar a estabilidade dessas substâncias (SIQUEIRA et al., 2007).

Segundo Thakkar et al. (2009) o cozimento e outros métodos de processamento aumentam a biodisponibilidade de carotenoides pela destruição da parede celular e das membranas de organelas em que carotenoides estão presentes. Isso facilita o acesso das enzimas digestivas para a liberação dos carotenoides da matriz em que estão aprisionados. O trabalho de Livny et al. (2003) constatou que a biodisponibilidade de  $\beta$ -caroteno em humanos foi maior na ingestão de purê de cenoura cozida, em comparação com a ingestão de cenoura crua. Similarmente, na digestão simulada, a eficiência de micelação do  $\beta$ -caroteno foi de 3% para cenoura crua e 27% para a cenoura cozida (HEDREN, 2002). Por outro lado, em estudo de Zhang et al. (1997), imagens microscópicas obtidas da fração micelar de mandioca cozida, mostra que, além das microesferas fluorescentes (micelas), observam-se pontos verdes de fluorescência

característicos do  $\beta$ -caroteno, aprisionados em uma estrutura supramolecular amorfa e complexa, compatível com a de géis de amido, possivelmente resultante do processo de cocção em água. A presença desses complexos que aprisionam o  $\beta$ -caroteno pode promover a redução da eficiência de micelização do mesmo em mandioca cozida (BOTELHO, 2011). Portanto, em relação à retenção dos carotenoides da mandioca após o processamento, existem diversas conclusões encontradas na literatura e muitas vezes os resultados são contraditórios, o que reforça a necessidade de avaliação desse parâmetro durante o processo.

Pesquisas envolvendo os efeitos do processamento térmico do trigo sarraceno investigaram principalmente os fenólicos totais, flavonoides e a capacidade antioxidante, devido ao papel fundamental desses compostos na prevenção de doenças. O tratamento térmico do trigo sarraceno implica em mudanças na sua composição química, e sobretudo, em suas propriedades funcionais (ZIELINSKI et al., 2009).

O processamento de alimentos pode afetar o teor de fenólicos e seus benefícios à saúde de forma positiva ou negativa. Diversos estudos reportaram sobre efeitos, prejudiciais ou benéficos, de processamentos térmicos como torra, aquecimento com vapor pressurizado, micro-ondas, fervura, cozimento, entre outros, em alimentos contendo fenólicos (ZIELINSKI et al., 2001; FARES et al., 2010; RAGAEI et al., 2012; JAMBREC et al., 2015).

Fares et al. (2010) constataram que durante o processamento de massas, em que água, oxigênio e calor potencializam as reações de oxidação, ocorre uma redução no teor de ácidos fenólicos livres, reconhecidos como sequestrantes de radicais livres. No entanto, após o cozimento, a massa teve um aumento de atividade antioxidante. Randhir et al. (2008) constataram que, após tratamento com autoclave houve um crescimento na atividade antioxidante em sementes e germinados. Além disso, reportou-se um crescimento de 20% e um decréscimo de 7% nos fenólicos totais em germinados e sementes, respectivamente. Corroborando com esses resultados, Zielinski et al. (2009) observaram a formação de produtos da reação de Maillard, induzida pelo tratamento térmico em sementes e grãos de trigo sarraceno. Além de formar cor, aroma e sabor em alimentos, os produtos da reação de Maillard também participam da formação de componentes com propriedades antioxidantes, antialérgicas, antimicrobianas e citotóxicas (MALGORZATA et al., 2016).

Alvarez-Jubete et al. (2010) verificaram que a germinação gera um aumento do teor de fenólicos totais e de capacidade antioxidante no grão de trigo sarraceno. Por outro lado, no mesmo estudo, concluiu-se que

produtos de panificação fabricados utilizando trigo sarraceno, em fornos a alta temperatura tem a capacidade antioxidante reduzida. Apesar disso, os pães de farinha de pseudocereais continham fenólicos em quantidades significativas, em particular os pães de trigo sarraceno germinado. Zielinski et al. (2006) mostraram que grumos submetidos à extrusão apresentaram redução da atividade antioxidante e aumento dos ácidos fenólicos livres. Zhang et al. (2010) reportaram um decaimento de atividade antioxidante na farinha de trigo sarraceno indiano (*Fagopyrum tataricum*) e redução dos flavonoides e fenólicos totais após a torra, tratamento com micro-ondas e especialmente após aquecimento com vapor comprimido.

Os resultados contraditórios relativos ao aumento ou diminuição de fenólicos totais e atividade antioxidante de grãos submetidos a tratamentos térmicos, reforçam a necessidade de acompanhar a concentração de componentes bioativos durante o processamento de alimentos (GIMÉNEZ-BATISDA, 2015).

Estudos mostram que o processamento térmico em frutas, vegetais e cereais pode ter um efeito de diminuição dos flavonoides (DIETRYCH-SZOSTAK e OLESZEK, 1999). A extensão da perda de flavonoides devido ao processamento mostrou-se altamente dependente de fatores como o tipo de substrato e condições de processamento, principalmente quanto à temperatura e tempo de processo (SENSOY et al., 2006). Chlopicka et al. (2012) reportaram que o teor total de flavonoides da farinha de trigo sarraceno foi aproximadamente 2-4 vezes maior do que em pães. Confirmando esses resultados, Im et al. (2003) verificaram que a rutina, um flavonoide do trigo sarraceno, é afetada pela temperatura e tempo de aquecimento de forma adversa. Portanto, deve-se sempre observar a extensão de degradação desses componentes durante o processamento de alimentos e avaliar se o produto final ainda apresenta concentrações apreciáveis com efeitos benéficos à saúde humana.

### 3.2.3.3 Mandioca como matéria-prima de uma cerveja funcional

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma planta perene, arbustiva, da família Euforbiácea. Possui produção viável em solos deficientes em fertilidade, é muito tolerante às doenças, à seca e às pragas, além de ser flexível quanto à época de colheita. A parte mais importante da planta é a raiz, rica em amido, utilizada na alimentação humana e animal (MORESCO, 2013). Segundo a Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Paraná (2014), o Brasil é o maior produtor de mandioca da América, com 7,7% do volume total de produção mundial. A safra

brasileira de 2014 foi de 23,14 milhões de toneladas, em uma área plantada de 2,34 milhões de hectares (IBGE, 2015). Além disso, comercialmente a mandioca é significativamente mais barata em países tropicais e subtropicais, onde normalmente é cultivada, comparada com outras fontes de amido, como cevada, arroz, trigo e milho (MANDANNA, HUGHES e BRYCE, 2012).

A mandioca é muito cultivada em países tropicais e subtropicais em que a população sofre de subnutrição, constituindo uma fonte alimentícia valiosa em países em desenvolvimento. Suas raízes são ótimas fontes de energia, mas são deficientes em proteínas, gordura, alguns minerais e determinadas vitaminas. Esforços para adicionar valor nutricional à mandioca (biofortificação) aumentando o teor de carotenoides, minerais, proteínas e outros compostos bioativos estão em voga atualmente (MONTAGNAC et al., 2009).

O interesse em incorporar carotenoides em alimentos tornou-se evidente desde a descoberta de que esses podem atuar na prevenção de doenças. Os carotenoides representam um dos maiores grupos de pigmentos naturais. Consistem num grupo amplamente distribuído entre pigmentos solúveis em lipídeos e são encontrados em todos os tipos de plantas. No entanto, humanos não são capazes de sintetizá-los, de modo que sua entrada no organismo deve vir da dieta, com o consumo de frutas e vegetais (KUHNEN et al., 2009). Perto de 40 carotenoides podem ser absorvidos, metabolizados e usados pelo organismo humano, mas apenas 6 são comumente detectados no plasma. Este grupo inclui  $\alpha$ - e  $\beta$ -caroteno, licopeno,  $\beta$ -criptoxantina e luteína (FERNÁNDEZ-GARCÍA et al., 2012). A mandioca enriquecida em  $\beta$ -caroteno, por exemplo, é uma valiosa fonte de vitamina A (MONTAGNAC et al., 2009).

Estudos já constataram que a produção de cerveja utilizando mandioca como adjunto é viável (VENTURINI FILHO e CEREDA, 1998; ASANTE, 2008; MANDANNA, HUGHES e BRYCE, 2012). A farinha de mandioca, em geral, apresenta menor teor de lipídeos e menor temperatura de gelatinização, o que torna o seu processamento mais simples e barato. No entanto, deve ser levado em consideração que a farinha de mandioca não é maltada. Isso implica que não houve ativação das enzimas amilolíticas, portanto, existe a necessidade de adicionar enzimas para liquefação e sacarificação do mosto, como foi feito por Venturini Filho e Cereda (1998), que produziram um hidrolisado utilizando enzimas comerciais ( $\alpha$ -amilase bacteriana termorresistente e  $\alpha$ -amilase fúngica) a partir de mandioca. Asante, 2008, concluiu que cervejas feitas predominantemente com mandioca tiveram boa aceitação

em painéis sensoriais e possuem maiores rendimentos de brassagem do que cervejas feitas predominantemente com cevada.

Portanto, é uma matéria-prima cervejeira interessante para ser estudada para elaboração de uma cerveja livre de glúten, uma vez que é fácil de ser cultivada, barata, possui raiz rica em amido, é abundante no Brasil e seu uso no processo cervejeiro já foi verificado e aprovado. Além disso, a mandioca biofortificada pode contribuir com o valor nutricional do produto.

### *3.2.3.3.1 Genótipo IAC 576-70*

A mandioca IAC 576-70 é resultado de pesquisas que tiveram início em 1970, pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), que buscavam variedades de mandioca mais nutritivas, resistentes a doenças e com maior produtividade. Para o desenvolvimento da variedade IAC 576-70 foi utilizado o método clássico de melhoramento genético, em que plantas com as características procuradas são cuidadosamente selecionadas e cruzadas para obtenção da variedade de interesse. A IAC-576-70 é pertencente à categoria mesa por apresentar baixo teor de glicosídeos cianogênicos, que conferem toxicidade à planta (MORESCO, 2013).

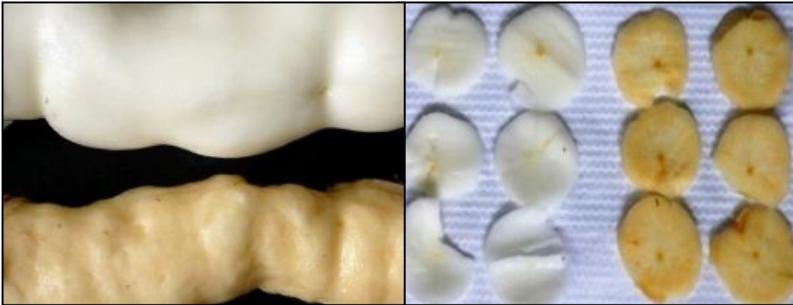
Uma importante característica da mandioca IAC 576-70 é seu alto valor nutricional. Outros genótipos de mandioca possuem 10 Unidades Internacionais (UI) de vitamina A, enquanto a IAC 576-70 possui 220 UI. O IAC recebeu o prêmio do 1º Concurso Frederico de Menezes Veiga, da Embrapa, e de acordo com a líder do Programa de Melhoramento Genético de Mandioca da instituição, a melhor variedade de mandioca de mesa desenvolvida pelo IAC é a IAC 576-70, conhecida popularmente como “Amarelinha” (Redação Sou Agro, 2014), devido ao seu teor de  $\beta$ -caroteno.

Welsch et al. (2010) demonstraram que plantas enriquecidas em  $\beta$ -caroteno produziam raízes de polpa amarela, com concentrações de carotenoides superiores às raízes controle, de polpa branca. A expressão do gene PHY favoreceu a acumulação de carotenoides em raízes de mandioca. Teores de carotenoides totais nas raízes brancas são, em base peso seco, de  $0,65 \pm 0,06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  enquanto que são de  $21,84 \pm 0,84 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  nos mutantes de coloração amarela.

O  $\beta$ -caroteno é de cor alaranjada, abundante em frutas e vegetais amarelo alaranjados e atua como antioxidante, o que o torna muito utilizado na prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo (AISSA et al., 2012). Esse carotenoide é o majoritário com atividade

provitamina A (RODRIGUEZ-AMAYA, 2010). A vitamina A é um importante nutriente não só para a visão e prevenção da nictalopia (cegueira noturna), mas também para função imunológica, crescimento, desenvolvimento e função gastrointestinal (DONHOWE et al., 2014). A Figura 5 ilustra a diferença entre raízes brancas e coradas, correspondentes a mandiocas comuns e enriquecidas em  $\beta$ -caroteno.

Figura 5 - Comparação de raízes brancas de mandioca (controle) com raízes amarelas, enriquecidas em  $\beta$ -caroteno.



Fonte: WELSCH et al., 2010.

Além dos carotenoides precursores de vitamina A, os não precursores, como a luteína e o licopeno, que também podem ser encontrados na mandioca, apresentam ação preventiva contra o câncer (AMBRÓSIO, 2006).

#### 3.2.3.4 Trigo sarraceno como matéria-prima de uma cerveja funcional

O trigo sarraceno comum (*Fagopyrum esculentum* Moench) é uma planta pertencente à família Polygonaceae. Seus grãos são semelhantes aos grãos de cereais, por isso, é considerado um pseudocereal (PHIRIAIS e ARENDT, 2008). Está principalmente distribuído em regiões montanhosas e frias, sofrendo de condições climáticas adversas, portanto, tem teor relativamente alto de amido resistente, comparado com outros cereais. Na China, de onde é originário, é consumido e processado tradicionalmente como alimento ou erva (LIU et al., 2015).

Estudos que focaram na produção de malte e cervejas a partir de cereais e pseudocereais sem glúten (BAUER et al., 2005; PHIRIAIS et al., 2005; WIJNGAARD e ARENDT, 2006; WIJNGAARD et al., 2006; PHIRIAIS e ARENDT, 2008) chegaram à conclusão de que o material

com maior potencial para produção de cerveja é o trigo sarraceno. Esse pseudocereal pode ser obtido com casca ou sem casca, sendo que estudos demonstraram que o uso do trigo sarraceno com casca é vantajoso, uma vez que resulta em maltes de alta qualidade e melhora a filtrabilidade do mosto cervejeiro.

Maccagnan et al. (2004), utilizaram trigo sarraceno como adjunto não maltado em uma microcervejaria, para a produção de cerveja sem glúten. Os resultados desse trabalho revelaram que o trigo sarraceno apresenta aparência e propriedades sensoriais satisfatórias. No entanto, estudos mostram que o conteúdo enzimático desse pseudocereal sem glúten é muito menor que o do malte de cevada e que o mosto do trigo sarraceno apresenta alta viscosidade (PHIARAIS et al., 2005; ZARNKOW et al., 2005). Esses problemas podem ser atenuados com adição de enzimas comerciais. Phiarais et al. (2006) descobriram que a adição crescente de  $\alpha$ -amilase no mosto de trigo sarraceno aumentou cor, extrato, filtrabilidade do mosto, fermentabilidade e extrato fermentável, além de diminuir a viscosidade. A adição crescente de amiloglucosidase resultou em aumento do nitrogênio solúvel total e FAN. Esses estudos mostraram que, ao aplicar enzimas comerciais, o malte de trigo sarraceno tem o potencial de substituir a cevada como matéria-prima sem glúten para os portadores de doença celíaca (PHIRIAIS e ARENDT, 2008).

O trigo sarraceno é altamente nutritivo e tem valor nutricional superior ao de grãos como o trigo e arroz. Dentre os pseudocereais, o trigo sarraceno é uma ótima fonte de aminoácidos essenciais, como lisina e treonina, flavonoides, ácidos fenólicos e taninos (JAMBREC et al., 2015). O consumo constante do trigo sarraceno pode prevenir indigestão, obesidade, constipação, colesterol, diabetes e hipertensão. A proteína do trigo sarraceno tem alto valor biológico, devido ao alto nível de lisina, além disso, contém fitoesteróis, como rutina, que melhora os níveis de colesterol e tem efeitos positivos em doenças crônicas, como diabetes tipo II (LI e ZHANG, 2001). O trigo sarraceno ainda possui altos níveis de fibra alimentar, seus lipídeos são ricos em gorduras insaturadas e contém ampla variedade de compostos bioativos, como polifenóis (WIJNGAARD e ARENDT, 2006; SWIECA, 2016).

Existe um crescente interesse em polifenóis (anéis de benzeno com um ou mais grupos hidroxila), que se deu devido a resultados de estudos epidemiológicos, ligando o consumo constante desse composto com redução do risco de doenças ligadas ao estresse oxidativo, como câncer e doenças cardiovasculares (HUGHES, 2001; CARVALHO, 2010; ALVAREZ-JUBETE et al., 2010), devido ao efeito antioxidante e inibidor da ação de radicais livres dos compostos fenólicos (PALOZZA,

2005). Estudo de Alvarez-Jubete et al. (2010) mostraram que dentre os extratos de sementes de quinoa, trigo, trigo sarraceno e amaranto, o trigo sarraceno foi a que apresentou o maior teor de fenólicos totais. Similarmente, o trigo sarraceno apresentou a maior capacidade antioxidante dos extratos de sementes, medida pelos métodos de FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) e DPPH (Radical 2,2-difenil-1-picril hidrazil). Concluiu-se, portanto, que a quinoa e o trigo sarraceno são melhores fontes de polifenóis em relação ao trigo e o amaranto, sendo que os polifenóis presentes no trigo sarraceno são a catequina e quercetina glicosídica. A qualidade absorviva desses polifenóis perde apenas para isoflavonas e ácido gálico.

Atualmente, o cuidado com a saúde é considerado crucial na indústria alimentícia, e tanto o ramo da agricultura quanto da indústria farmacêutica constantemente procuram materiais naturalmente ricos em flavonoides com alto potencial antioxidante. O trigo sarraceno tem se mostrado uma matéria-prima atrativa para esse fim (SYTAR, 2015), ganhando fama pelo amplo espectro de flavonoides, sendo que a rutina e quercetina estão presentes em maior quantidade (JAMBREC et al., 2015).

Os flavonoides são metabólitos secundários de plantas, encontrados em folhas, frutos, sementes e flores, e tal como ocorre com os carotenoides, esses compostos não são sintetizados por humanos, portanto, devem ser consumidos. Os flavonoides atuam na regulação de genes envolvidos nos estados crônicos de doenças inflamatórias, que aumentam a ação inflamatória pela expressão de citocinas e quimiocinas. Frutas, vegetais e chás, ricos em flavonoides, podem bloquear proteínas com ação inflamatória, atuando como inibidores naturais (HOENSCH e OERTAL, 2015). Os flavonoides também atuam como antioxidantes naturais, benéficos para prevenir o dano às células por espécies oxigenadas reativas às células. O estresse oxidativo consiste em um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, que favorece doenças como diabetes, hipertensão, obesidade e quadros inflamatórios. Essa condição é induzida por espécies oxigenadas reativas, como radicais hidroxila, geradas como subprodutos do metabolismo e da respiração (WU et al., 2015). Além das propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes dos flavonoides, estudos *in vivo* de Rawson et al. (2014) forneceram fortes evidências de que flavonoides cítricos possuem atividade contra câncer de pele, cólon, próstata, pulmão e fígado.

Nessa conjuntura, o trigo sarraceno mostra-se promissor para elaboração de uma cerveja bioativa, devido a suas propriedades antioxidantes, teor de fenólicos e flavonoides, alto valor nutricional e prevenção de doenças. Além disso, confere propriedades sensoriais ao

produto semelhantes às da cevada, facilitando assim a aceitação do público. É o grão mais recomendado da literatura para elaboração de uma cerveja sem glúten e já foi testado e aprovado como matéria-prima cervejeira.

Tendo em vista o potencial do trigo sarraceno para elaboração de uma cerveja funcional e que a mandioca, além de constituir uma reserva energética fisiológica, com alto teor de carboidratos (80 a 90% em massa seca), concentrações de micronutrientes próximas a diversas leguminosas e teor de cálcio e vitamina C relativamente elevados, que ainda pode ser biofortificada para conferir outros aspectos funcionais ao produto, como diferentes carotenoides, conclui-se que essas são matérias-primas muito indicadas para produção de uma cerveja funcional sem glúten.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATÉRIAS-PRIMAS

#### 4.1.1 Genótipo de mandioca IAC 576-70

O genótipo de mandioca IAC-576-70 foi obtido a partir do Banco de Germoplasma do Programa de melhoramento genético de mandioca da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri - Estação Experimental de Urussanga - EEUR).

#### 4.1.2 Malte e outros insumos

O malte de trigo sarraceno selecionado para o presente projeto é originário da Bélgica, sua denominação é *Château Buckwheat*<sup>®</sup>, e pertence à safra de 2014 da Castle Malting<sup>®</sup>.

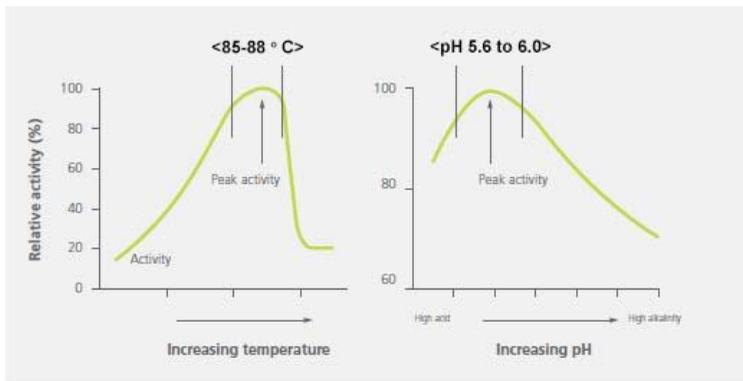
O lúpulo utilizado foi o *Cascade* em *pellets*, da Castle Malting<sup>®</sup>, originário dos Estados Unidos, com teor de alfa ácidos de 4,8-7%.

A levedura utilizada foi a safebrew T-58<sup>®</sup>, da Fermentis<sup>®</sup>, com  $19 \times 10^9$  células viáveis/grama e com dosagem recomendada de 50-80 g/hL.

Para floculação e precipitação das proteínas do *truib* foi utilizado o *whirlfloc G*<sup>®</sup> granulado, originário da Irlanda e com dosagem máxima recomendada de 1 g para 25 litros de mosto em fervura.

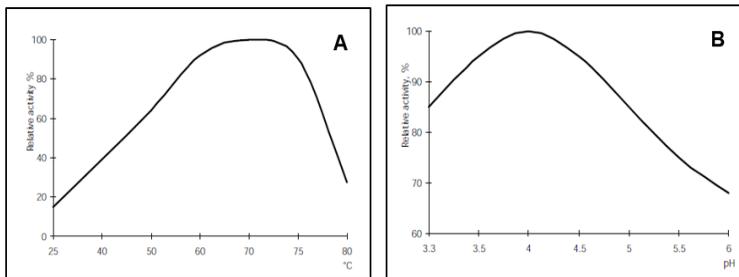
As enzimas utilizadas na hidrólise do amido foram a Termamyl SC DS<sup>®</sup> e a Saczyme<sup>®</sup> da Novozymes<sup>®</sup>. A Termamyl SC DS<sup>®</sup> é uma  $\alpha$ -amilase termorresistente, obtida por fermentação submersa. A Saczyme<sup>®</sup> é uma glucoamilase obtida a partir do *Apergillus niger*. Nos gráficos das Figuras 6 e 7, está representada a variação de atividade das enzimas mencionadas com aumento de temperatura e pH. A temperatura ideal de operação da Termamyl<sup>®</sup> SC é de  $\sim 86$  °C e o pH é 5,8 e a temperatura ideal de operação da Saczyme<sup>®</sup> é de 70 °C e o pH é  $\sim 4,2$ .

Figura 6 - Influência do pH e da Temperatura na Atividade da Enzima Termamyl SC DS® da Novozymes.



Fonte: Novozymes, 2013.

Figura 7 - Atividade vs Temperatura da Enzima Saczyme® da Novozymes em pH 4,3 (A) e Atividade vs pH da Enzima Saczyme® da Novozymes em 65 o C (B).



Fonte: Novozymes, 2015.

## 4.2 PREPARO INICIAL DA MANDIOCA

A mandioca IAC-576-70 foi obtida em forma de raízes frescas congeladas. Foi necessário transformá-la em farinha (Figura 8) para aplicá-la no processo cervejeiro. Para obter a farinha a partir da raiz fresca, a mesma foi moída em ralador (Arbel modelo RLM 120), prensada em equipamento com capacidade de 40 kg, de aço inox, com cesto de 30 cm de diâmetro, e submetida a secagem em estufa a 60 °C durante 48

horas. Após a secagem, a farinha foi peneirada (28 *mesh*), sendo que os grumos mais grossos foram triturados e novamente peneirados.

Figura 8 - Secagem da Farinha de Mandioca IAC-576-70.



### 4.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

#### 4.3.1 Umidade

A umidade do trigo sarraceno e da mandioca foi medida conforme o método da American Society of Brewing Chemists (ASBC, 2009). Primeiramente o forno foi calibrado. O procedimento de calibração consistiu em pesar as amostras em duplicata, em balança de precisão, e colocá-las em forno à 103-104 °C, onde ficaram durante 3 horas. Em seguida, as amostras foram resfriadas em dessecador, novamente pesadas e devolvidas ao forno por mais 1 hora. A diferença de umidade entre as amostras que ficaram 3 e 4 horas no forno foi inferior a 0,1%, portanto, o tempo de forno adotado para a análise foi de 3 horas. Caso a diferença fosse superior a 0,1%, a temperatura do forno deveria ser aumentada em 1 °C e a calibração feita novamente. Assim, foi possível calcular a umidade nos cereais e adjuntos conforme a equação abaixo:

$$U, \% \text{ grama/grama} = \frac{(A - B)}{A} \times 100 \quad (3.1)$$

Sendo:

A = massa da amostra antes da secagem, g

B = massa da amostra após a secagem, g

U = Umidade, % g/g

### 4.3.2 Temperatura de gelatinização

A temperatura e o calor absorvido devido à gelatinização foram observados utilizando DSC (*Differential Scanning Calorimetry* ou Calorimetria Exploratória Diferencial). Foi elaborada uma emulsão das amostras previamente, em uma proporção 2:1, de massa de água por massa seca de amostra. Aproximadamente 20 mg de emulsão foram pesadas em recipiente de alumínio, que em seguida foi lacrado e preparado para leitura no DSC (Perkin-Elmer, Jade, Massachusetts/USA) que usa o *software* Pyris DSC. A temperatura aplicada foi de 20 °C até 100 °C e a velocidade de aquecimento foi de 5 °C/min.

### 4.3.3 Teor de extrato

#### 4.3.3.1 Malte 6-Row (6-Fileiras)

Antes de medir o teor de extrato da mandioca e do trigo sarraceno, foi medido o teor de extrato do malte *6-row*, utilizando o método da ASBC (2009). Isso foi necessário pois o método de avaliação do extrato de cereais diferentes do trigo e da cevada envolve matérias-primas que não possuem enzimas suficientes para a conversão satisfatória do amido, impossibilitando a análise de extrato. Aplica-se, portanto, uma porção de malte (3:2), com alto poder diastático (*6-row*) e teor de extrato conhecido (motivo pelo qual mede-se o teor de extrato do malte *6-row*), que atua como um auxiliar da análise suprimindo a deficiência de enzima das matérias-primas avaliadas e possibilitando a conversão do amido. Resumidamente, moeu-se, peneirou-se, pesou-se 50 g de malte moído, adicionou-se 200 mL de água destilada e fez-se o descanso proteico em banho a 45 °C por 30 minutos com agitador mecânico. Em seguida, iniciou-se a mosturação, que consistiu em adicionar 100 mL ao mosto e manter a temperatura em 70 °C durante 1 hora. A conversão do amido em açúcares fermentáveis foi acompanhada durante a mosturação coletando amostras a cada 10 minutos para o teste com iodo, sendo que a conversão é considerada completa quando a cor da gota da amostra com a gota do iodo na placa de teste é amarela/alaranjada. Após a mosturação, resfriou-se o mosto rapidamente e completou-se sua massa total para 450 g, em seguida, filtrou-se o mosto com papel filtro dobrado em funil de vidro com 20 cm de diâmetro. Mediu-se a densidade do filtrado utilizando um picnômetro, conforme descrito no subitem 4.5.3.1. Calculou-se o extrato utilizando as seguintes fórmulas:

$$\text{Massa total do mosto, } g = \frac{(M + 800)x100}{100 - P} \quad (3.2)$$

$$\text{Extrato, \% } g/g = \frac{\text{Massa total do mosto}}{100} \times P = \frac{Px(M + 800)}{100 - P} \quad (3.3)$$

$$\text{Extrato, base seca, \% } g/g = \frac{100xE}{100 - M} \quad (3.4)$$

Sendo:

P = g de extrato em 100 g de mosto (° Plato)

M = Umidade do malte, % g/g

E = Extrato, % g/g

Vale ressaltar que as fórmulas 3.2, 3.3 e 3.4 são do próprio método de medição do extrato ASBC (2009). A massa total do mosto é originária de um balanço de massa, em que a massa total do mosto se iguala à soma da massa de água, umidade da cevada e extrato. O método utiliza uma base de cálculo de 100 g de cevada e 800 g de água, visto que são utilizadas 50 g de cevada para 400 g de água na análise.

O valor de P foi encontrado com base na densidade do filtrado, utilizando a *Table 1* em *Tables related to Determinations on Wort, Beer, Brewing Sugars and Syrups* (ASBC, 2009).

#### 4.3.3.2 Matérias-primas

Utilizando o resultado obtido de extrato do malte 6-row, pôde-se calcular o extrato das matérias-primas conforme o método internacional de conversão de malte, da ASBC (2009). Brevemente, moeu-se, peneirou-se e misturou-se 20 g da amostra e 5 g de cevada 6-row, ferveu-se a mistura por 30 minutos, resfriou-se, adicionou-se mais 25 g de cevada 6-row (moída e peneirada) e fez-se um descanso proteico de 30 minutos seguido de 1 hora de mosturação em banho isotérmico, à temperatura constante de 70 °C. Acompanhou-se a conversão do amido conforme descrito anteriormente. Após a mosturação, resfriou-se o mosto rapidamente e ajustou-se a massa total para 450 g com água destilada. Filtrou-se o mosto com papel filtro dobrado e um funil de vidro. Mediu-se a densidade do filtrado utilizando um picnômetro, conforme descrito no subitem 4.5.3.1.

Calculou-se o extrato pela seguinte fórmula:

$$\text{Extrato total} = \frac{Px(800 + 0,6M_m + 0,4M_c)}{100 - P} \quad (3.5)$$

Sendo:

Extrato total = g de extrato em 100 g de mistura de cevada com amostra de interesse

P = g de extrato em 100 g de mosto de mistura de cevada com amostra de interesse

$M_m$  = umidade do malte 6-row, % g/g

$M_c$  = umidade da amostra de interesse, % g/g

Vale ressaltar que a fórmula 3.5 foi deduzida de forma similar à fórmula 3.3 e que o extrato total é o extrato da mistura de cevada 6-row e da amostra de interesse. Para encontrar o % de extrato (g/g) somente da amostra de interesse, utilizou-se:

$$\text{Extrato da amostra, \% g/g} = \frac{(\text{Extrato total} - 0,6xE_m)}{40} \times 100 \quad (3.6)$$

$$\text{Extrato da amostra, base seca, \% g/g} = \frac{100xE}{100 - M_c} \quad (3.7)$$

Sendo:

$E_m$  = Extrato do malte 6-row, % g/g

$E$  = Extrato da amostra de interesse, % g/g

Para encontrar o extrato da amostra de interesse, a fórmula 3.6 foi utilizada, a partir do método internacional de conversão de malte, da ASBC (2009). Essa fórmula utiliza o extrato total e desconta a contribuição (3:5 ou 60%) do malte de cevada 6-row, cujo o extrato foi medido anteriormente e portanto é conhecido.

#### **4.3.4 Perfil carotenóidico e quantificação de carotenoides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) das matérias-primas e das cervejas**

##### **4.3.4.1 Extração de carotenoides da raiz fresca e da farinha de mandioca IAC 576-70**

Os carotenoides foram extraídos conforme descrito por Rodriguez-Amaya & Kimura (2004). Foram pesados 2,5 g da raiz fresca e cozida ou farinha e adicionou-se 5 ml de acetona, incubando-se por 10 min. Ao meio de reação, 5 ml de éter de petróleo foram adicionados, as amostras foram homogeneizadas (1 min) com auxílio de Ultra-turrax (IKA Janke &

Kunkel – T25 basic) e centrifugadas (Eppendorf 5810R) a 3000 rpm/10 min., a 10°C. A fase orgânica foi coletada e a extração repetida com o resíduo utilizando 2,5 ml de acetona e 2,5 ml de éter de petróleo, seguida de centrifugação. À fase orgânica acrescentaram-se 5 ml de solução de NaCl 0,1M, seguido de centrifugação (300 rpm/7 min., 10°C). Este processo de lavagem foi repetido duas vezes e a fase aquosa extraída manualmente com pipeta Pasteur. Éter de petróleo foi adicionado aos extratos ajustando-se o volume em 7,5 ml.

#### 4.3.4.2 Quantificação de carotenoides por CLAE

Para as determinações por CLAE da raiz fresca e das farinhas foi utilizado o método de Moresco (2013). A fração organossolvente do extrato foi concentrada em fluxo de nitrogênio e o extrato concentrado totalmente dissolvido em 0,5 mL de hexano. Para as determinações por CLAE das cervejas, foi feita a degaseificação utilizando ultrassom (USC – 1450A). Todas as amostras, concentrado da raiz fresca e da farinha em hexano e as cervejas degaseificadas, foram centrifugadas (4000rpm/15min), filtradas (0,22  $\mu\text{m}$ ) e injetadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10A), equipado com termostatizador (35 °C), coluna de fase reversa C18 (Vydac 201TP54) acoplada à pré-coluna (C18, Vydac 201TP54) e detector espectrofotométrico (450  $\text{nm}$ ). A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90: 10, v/v), fluxo de 1 mL/min e a identificação dos compostos de interesse foi efetuada por comparação dos tempos de retenção de amostras de compostos padrões puros, sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenoides utilizou curva padrão externa (Sigma-Aldrich, MO-USA -  $\beta$ -caroteno  $y = 1,019x$ ,  $r^2 = 0,99$ ; luteína e  $\beta$ -criptoxantina  $y = 7044,96x$ ,  $r^2 = 0,99$ ; licopeno  $y = 4096,947x$ ,  $r^2 = 0,98$ ), considerando-se os valores de áreas dos picos de interesse para efeitos de cálculos das concentrações dos analitos.

#### 4.3.4.3 Atividade equivalente de vitamina A e retinol (RAE)

A fórmula 3.8, mostrada a seguir, foi desenvolvida para calcular a atividade total de vitamina A (retinol) equivalente de amostras, permitindo a comparação entre componentes ricos em carotenoides provitamina A. Isso permite definir quantitativamente a bioatividade de um alimento, uma vez que carotenoides provitamina A possuem diferentes atividades equivalentes, variando conforme suas composições químicas.

A atividade de vitamina A do trans- $\beta$ -caroteno foi determinada como aproximadamente 50% da atividade da própria vitamina A (retinol), o que significa que 1 equivalente de retinol (RAE) é o mesmo que 2  $\mu\text{g}$  de trans- $\beta$ -caroteno (TRUMBO et al., 2003). No entanto, Yeum e Russel (2002) sugerem que 6  $\mu\text{g}$  de trans- $\beta$ -caroteno são necessários na dieta para que se atinja o mesmo efeito que 1  $\mu\text{g}$  de trans- $\beta$ -caroteno purificado, levando em consideração a biodisponibilidade. Portanto, o fator de 12:1 é utilizado para o cálculo da atividade equivalente em vitamina A (retinol) do trans- $\beta$ -caroteno ingerido. Outros carotenoides precursores da vitamina A, como o trans- $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -criptoxantina, tem apenas metade da atividade biológica do trans- $\beta$ -caroteno, portanto, a ingestão de 24  $\mu\text{g}$  desses compostos são necessárias para que se atinja 1 RAE.

Com base no exposto acima, o RAE (Retinol Activity Equivalents ou Atividade total em equivalentes de retinol) das amostras pôde ser calculado utilizando a fórmula:

$$tRAE (\mu\text{g}) = \frac{\sum_{n=1}^n(pVACS) + 2(tbc)}{24} \quad (3.8)$$

Sendo:

tRAE = atividade total em equivalentes de retinol da amostra

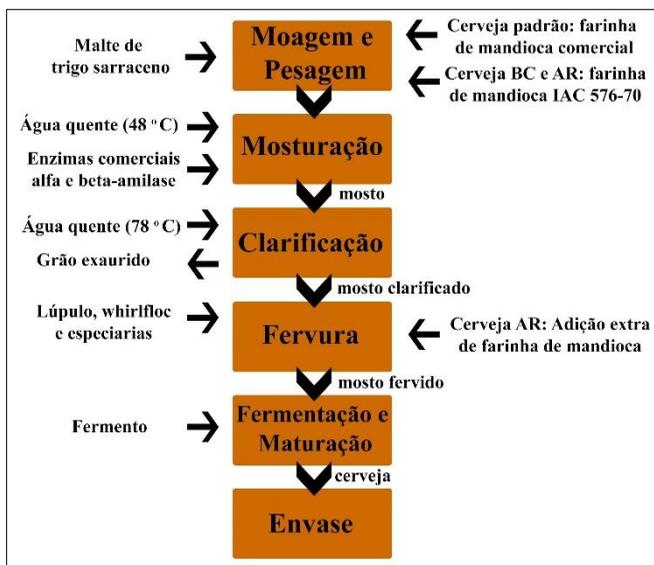
pVACS = carotenoides precursores da vitamina A ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, cis- $\beta$ -caroteno; 24 pVACS = 1 RAE)

tbc = trans- $\beta$ -caroteno (12 tbc = 1 RAE)

#### 4.4 PRODUÇÃO DE CERVEJA

Foram elaboradas três cervejas, com diferentes características, que tiveram suas propriedades bioativas, físico-químicas, teor de glúten e de amido resistente comparados. A primeira cerveja elaborada foi uma cerveja padrão, feita com farinha de mandioca comercial e malte de trigo sarraceno. A segunda cerveja elaborada foi a cerveja BC, feita com a farinha do genótipo de mandioca IAC 576-70 e malte de trigo sarraceno. A terceira e última cerveja elaborada foi a cerveja AR, feita com a farinha do genótipo de mandioca IAC 576-70 e trigo sarraceno, sendo que nessa cerveja houve uma adição extra de 100 g de farinha de mandioca durante a fervura, com a finalidade de verificar a presença de amido resistente no produto final. A figura 9 mostra o fluxograma do processo, ilustrando a ordem das etapas e ressaltando a diferença de cada formulação de cerveja:

Figura 9 – Fluxograma do processo utilizado para elaboração das cervejas padrão, AR e BC



As etapas da figura 9 estão descritas com mais detalhes a seguir:

a) *Pesagem e Moagem:* Em todas as formulações foram utilizados 3,04 kg de trigo sarraceno e 2,71 kg de farinha de mandioca, sendo que a cerveja AR utilizou 100 g extras de farinha, ou seja 2,81 kg. O critério utilizado para a escolha da proporção mássica das matérias-primas ricas em amido foi que cada uma delas contribuísse com 50% do extrato total, calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$E_{tm} = \sum_{n=1}^n M_n \left(1 - \frac{U_n}{100}\right) \frac{E_n}{100} \quad (3.9)$$

Sendo:

$E_{tm}$  = extrato total máximo da formulação (%)

$n$  = Matéria-prima

$M_n$  = massa da matéria-prima  $n$  (g)

$U_n$  = umidade (%) da matéria-prima  $n$

$E_n$  = extrato (%) medido da matéria-prima  $n$

O malte de trigo sarraceno foi moído em um moinho de disco (Guzzo) até a quebra da casca (Figura 10).

Figura 10 - Malte de trigo sarraceno moído.



*b) Mosturação:* Adicionou-se 19,5 litros de água aquecida a 48 °C à farinha e aos grãos moídos, a fim de se alcançar uma temperatura de equilíbrio de 45 °C. A Figura 11 ilustra a mosturação do trigo sarraceno e da mandioca em reator de 32 litros.

Figura 11 - Mosturação da cerveja padrão de mandioca comum e malte de trigo sarraceno.



Após o descanso proteico a 45 °C, a temperatura foi aumentada até 80 °C, sendo que antes de chegar à temperatura de gelatinização do amido das matérias-primas (50 °C), foram adicionados 10 mL de enzima Termamyl SC DS®. A temperatura foi mantida a 80 °C por 50 minutos, reduzida para 65 °C e então foram adicionados 10 mL de enzima Saczyme®.

O método de mosturação selecionado foi de infusão, que demanda menos energia e possui simples controle. Durante a mosturação, foram realizados testes com iodo, para acompanhar a conversão de amido em açúcares, e mediu-se o pH.

A rampa de temperatura aplicada durante a mosturação pode ser visualizada no item de discussão de resultados, Figura 17 do subitem 5.2.

c) *Clarificação*: Ao fim da mosturação, o mosto foi recirculado até sua clarificação, sendo que os próprios grãos atuaram como um leito filtrante acima do fundo falso do reator. Ao mesmo tempo que o mosto clarificado foi transferido para o tanque de fervura, realizou-se a aspersão contínua, adicionando-se 17 litros de água a 75 °C. O método de aspersão contínua possui as vantagens de produzir um mosto mais clarificado, permitir menos contato com oxigênio (sabor mais estável) e de ser um processo mais rápido.

d) *Fervura*: Assim que a fervura teve início foi realizada a primeira adição de lúpulo, 40 g de lúpulo *Cascade*. A segunda adição de lúpulo, 20 g de lúpulo *Cascade*, foi realizada após 45 minutos de fervura e adicionou-se ainda 20 g de coentro, 30 g de casca de laranja e 1 g de *whirlfloc*.

O mosto foi fervido por 1 hora com uma velocidade de evaporação de 3 L/hora. A cerveja AR teve uma adição extra de 100 g de farinha de mandioca após 15 minutos de fervura, a fim de possibilitar a formação de amido resistente tipo AR 3 no produto final.

A eficiência da brassagem foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\eta = \frac{E_{mf} \times D_{mf} \times C \times V_{mf}}{M_g} \quad (3.10)$$

Sendo:

$\eta$  = Eficiência da brassagem, %

$E_{mf}$  = Teor de extrato medido do mosto fervido,  $\frac{\text{gramas de extrato}}{100 \text{ gramas de mosto}}$

$D_{mf}$  = Densidade de mosto fervido, kg/L

$C$  = Constante aplicada para correção da dilatação do volume de água (0,96)

$V_{mf}$  = Volume de mosto fervido, L

$M_g$  = Massa de grãos adicionada, kg

e) *Resfriamento e aeração*: O resfriamento foi realizado utilizando uma serpentina com circulação de água em temperatura ambiente. A aeração foi feita utilizando o aerador (Betta Silente) com filtro chromafil® acoplado de 0,20  $\mu\text{m}$  durante 10 minutos.

f) *Fermentação*: Após o resfriamento, quando a temperatura alcançou 24-25 °C, 1 *sachet* de levedura safebrew T-58® (11,5 g) foi adicionado ao mosto. A fermentação foi realizada em uma geladeira com temperatura controlada de 16 °C e foi acompanhada diariamente até alcançar a densidade relativa final de 1,011-1,013. O grau de fermentação real foi calculado segundo as seguintes fórmulas:

$$GRF = \frac{100(O - E)}{O} \times \frac{1}{1 - (C.E)} \quad (3.11)$$

$$O = 2A + E - FC \quad (3.12)$$

Sendo:

GRF = Grau de fermentação real (%)

O = Extrato original (°P)

$C$  = Constante aplicada para corrigir a perda de massa por gás carbônico e formação de novas células de levedura durante a fermentação (0,00516)

E = Extrato real (% g/g)

A = Teor alcoólico (% g/g)

FC = Fator de correção, obtido na *Table 3* em *Tables related to Determinations on Wort, Beer, Brewing Sugars and Syrups* (ASBC, 2009)

A fórmula 3.11 refere-se à fração de extrato originalmente presente no mosto que foi efetivamente convertida em álcool e CO<sub>2</sub>. O cálculo do grau de fermentação real exige o conhecimento do extrato original, que é o teor de extrato antes da fermentação, obtido a partir da fórmula 3.12, utilizando dados de extrato real, que é o extrato que permaneceu na cerveja, e teor alcoólico.

g) *Maturação*: Ao fim da fermentação, iniciou-se a maturação ajustando a temperatura da geladeira para 4 °C, mantendo-a por 7 dias.

h) *Envase*: Optou-se por envasar a cerveja em garrafas de vidro âmbar, devido à facilidade, ao fato de não adicionar sabor, impermeabilidade para gases, resistência ao calor e proteção da luz.

## 4.5 ANÁLISES DO PRODUTO FINAL

### 4.5.1 Densidade relativa

#### 4.5.1.1 Picnômetro

A medição da densidade com o picnômetro é importante como análise acessória do teor alcoólico, do extrato residual, do teor de extrato total e como um parâmetro definir um estilo de cerveja e acompanhar a fermentação. Foi utilizado um picnômetro de 50 mL. Nesse método, são pesadas em picnômetro a amostra e água (equilibradas a 20 °C) para encontrar a densidade relativa da amostra. Primeiramente determinou-se o peso seco do picnômetro em balança de precisão, secando-o completamente com ar comprimido. Em seguida, determinou-se o valor da água, preenchendo o picnômetro completamente com água destilada e pesando-o novamente em balança de precisão. Finalmente, o picnômetro foi completado com a amostra e pesado em balança de precisão. Vale ressaltar que alguns cuidados foram tomados durante as pesagens, como jamais tocar diretamente no picnômetro, secar o pescoço e o exterior do picnômetro até não haver gotas sobressalentes, esperar o tempo necessário para o equilíbrio da massa na balança e realizar diversas leituras em cada etapa, até encontrar massa constante. Apurou-se a densidade relativa da amostra efetuando o seguinte cálculo:

$$Dens. rel. = \frac{\text{massa do picnômetro com amostra} - \text{massa do picnômetro vazio}}{\text{massa do picnômetro com água} - \text{massa do picnômetro vazio}} \quad (3.13)$$

A concentração de açúcares (°Bx) pode ser encontrada a partir da densidade relativa a 20 °C.

#### 4.5.1.2 Hidrômetro

Durante o processo de elaboração das cervejas experimentais, a densidade foi acompanhada utilizando o hidrômetro, que permitiu

verificar a necessidade de ajustes no processo, como aumento o tempo de fervura para aumentar a densidade ou adição de água à fervura para redução da densidade, possibilitando a padronização das cervejas. Além disso, a medida da densidade com o hidrômetro permite o acompanhamento de forma rápida e prática da fermentação, indicando o seu fim.

O hidrômetro é um instrumento de fácil utilização, proporciona leituras rápidas de densidade relativa e permite o fácil acompanhamento de diversas etapas do processo cervejeiro. Consiste em um aparelho em corpo de vidro, com um peso na parte inferior (feito com pequenas bolas de metal) e uma haste graduada, onde os valores de densidade são lidos. O hidrômetro afunda no líquido (amostra) até onde a massa do líquido e do ar deslocados é igual à massa do hidrômetro. A faixa de medição do aparelho é definida pela massa das bolas de metal. Deve-se observar para qual líquido o aparelho foi calibrado e a temperatura da amostra.

#### 4.5.1.3 Refratômetro

O refratômetro é outro instrumento utilizado para medição da densidade relativa, é analógico e baseia-se no índice de refração do líquido. Esse método não é preciso como o do picnômetro, mas é de fácil utilização e proporciona leituras rápidas, como o hidrômetro, tendo a vantagem adicional de utilizar pouca quantidade de amostra.

Foi utilizado um refratômetro portátil (AKSO-AK90), juntamente ao hidrômetro, durante a elaboração das cervejas para acompanhar a densidade. Para a análise da amostra, uma ou duas gotas foram coletadas, colocadas no aparelho, a tampa foi fechada para espalhar a gota sobre o prisma (bolhas de ar foram evitadas) e a leitura foi feita contra a luz, através da lente de aumento do próprio aparelho, e a concentração foi medida em °Bx.

#### 4.5.2 Teor alcoólico

O teor alcoólico foi medido segundo o método volumétrico da ASBC (2009). Foi montada a vidraria de destilação de forma a evitar perdas pelas conexões, que empregou um frasco de destilação de 500 mL, conector com válvula, condensador horizontal e manta de aquecimento (Fisatom – Classe 300 – com regulador de potência). Para receber o destilado, utilizou-se uma proveta de 100 mL. A amostra de cerveja, em duplicata, foi degaseificada e adicionou-se 100 mL no frasco de destilação com mais 50 mL de água destilada. Destilou-se 96 mL em velocidade

constante. Completou-se o volume para 100 mL e determinou-se a densidade relativa utilizando um picnômetro. A porcentagem de álcool em volume foi lida na *Table 2* em *Tables related to Determinations on Wort, Beer, Brewing Sugars and Syrups* (ASBC, 2009), utilizando os dados da densidade do destilado e da cerveja.

#### 4.5.3 Extrato residual

O extrato residual foi medido segundo o método volumétrico da ASBC (2009) a partir do resíduo do frasco de destilação utilizado para medir o teor alcoólico. O resíduo foi transferido para uma proveta de 100 mL. O volume foi completado e equilibrado a 20 °C. A densidade foi medida utilizando o picnômetro e encontrou-se a quantidade de extrato em gramas por 100 gramas de solução desalcooolizada, utilizando *Table 1* em *Tables related to Determinations on Wort, Beer, Brewing Sugars and Syrups* (ASBC, 2009), e efetuou-se o seguinte cálculo:

$$\text{Extrato residual, \% mássico} = \frac{G \times \text{densidade da solução residual}}{\text{densidade da cerveja}} \quad (3.14)$$

Sendo:

G = g de extrato em 100 g de solução de resíduo do frasco de destilação

#### 4.5.4 Cor

Os métodos mais comuns para se medir a cor da cerveja são a utilização de uma *colorwheel* e o método colorimétrico. A *colorwheel* consiste em uma paleta de cores com os valores em SRM (*Standard Reference Method*), como a da Figura 12, sendo que a cor é estimada por comparação visual.

A cerveja foi filtrada e centrifugada até apresentar-se livre de turbidez e então foi submetida em triplicata à leitura no espectrofotômetro UV-Visível (*Gold spectrum lab 53 UV-Vis spectrophotometer, BEL photonics, Brazil*) no comprimento de onda de 430 nm. Foi utilizada uma cubeta de 1 cm, portanto, aplicou-se um fator de correção para o caminho da luz de ½ polegada. Utilizou-se a fórmula abaixo para o cálculo da cor, sendo que o valor é expresso em SRM:

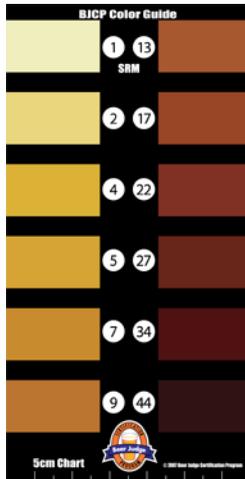
$$\text{Cor da cerveja, SRM} = 10 \times A \times F_c \quad (3.15)$$

Sendo:

$A$  = Absorbância da amostra em 430 nm

$F_c$  = Fator de correção para a cubeta de 1/2 polegada (para a cubeta de 10 mm o fator é 1,27)

Figura 12 - Guia visual de cores (SRM).

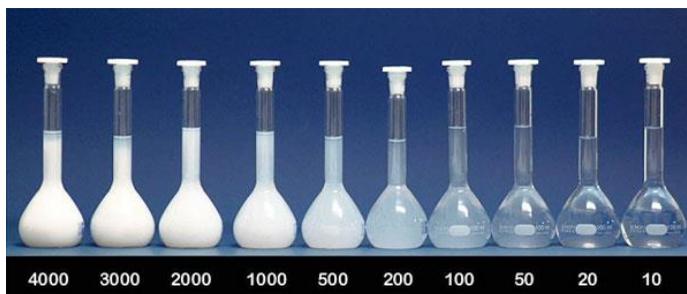


Fonte: Beer Judge Certification Program (BJCP), 2015.

#### 4.5.5 Turbidez

A claridade da cerveja, ou ausência de turbidez, é uma propriedade importante. A turbidez pode estar presente devido a fatores processuais, como resultado de envelhecimento ou resfriamento do produto, ou por característica do produto, como no presente caso, pela presença de amido resistente. A forma de medir esse parâmetro deve ser reprodutível e padronizada. Os padrões de turbidez de formazina se consagraram como uma referência, sendo que os valores são reportados na unidade FTU (*Formazin Turbidity Units*). A análise pode ser feita por inspeção visual e comparação com os padrões (Figura 13), no entanto, com o auxílio de um turbidímetro, os mesmos padrões podem ser utilizados para obter-se maior precisão.

Figura 13 - Padrões de Formazina de 10 a 1000 FTU.



Fonte: GLOBALSPEC, 2015.

A turbidez da cerveja foi medida utilizando o método dos padrões de turbidez de formazina, da ASBC (2009). Primeiramente foi elaborada uma solução de sulfato de hidrazina, 0,966 g em 100 mL, aguardou-se a total diluição, e uma solução de hexametenotetramina, 2417 g em 25 mL. Em seguida, foi elaborada a solução de estoque, que consistiu em misturar as soluções de hidrazina e hexametenotetramina, e aguardou-se 24 horas para a precipitação completa da formazina. O padrão de 10,000 FTU foi feito a partir da diluição de 15 mL da solução de estoque para 100 mL. Os demais padrões (2000, 4000, 6000, 8000) foram elaborados a partir de diluições do padrão de 10,000 FTU. Os padrões foram visualmente comparados com as cervejas e definiu-se a turbidez de cada amostra.

#### 4.5.6 Concentração de *Free Amino Nitrogen* (FAN) do mosto e da cerveja

O método da ninidrina, ou método internacional de medida de FAN da ASBC (2009), pode ser utilizado para determinar a quantidade de nitrogênio amínico livre no mosto e na cerveja para conhecer a quantidade de nitrogênio assimilável disponível para a levedura durante a fermentação e o residual após a fermentação. O método quantifica aminoácidos, amônia e em algum grau, nitrogênio amínico em peptídeos e proteínas.

Foi elaborado o reagente de cor empregando ninidrina e o padrão de glicina, contendo exatamente 2 mg de nitrogênio amínico por litro. Foram coletadas amostras do mosto durante a elaboração da cerveja e amostras de cervejas prontas. Para análise, filtrou-se e diluiu-se o mosto

100 vezes e a cerveja foi degaseificada, filtrada e diluída 50 vezes. Adicionou-se 2 mL das amostras em tubos de ensaio, incluindo água destilada (branco) e o padrão de glicina. Em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente de cor e os tubos foram colocados em banho fervente por 16 minutos. Resfriou-se os tubos, adicionou-se 5 mL de solução de diluição em cada tubo e mediu-se os resultados em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda de 570 nm. Para encontrar a concentração de FAN, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$FAN \left( \frac{mg}{L} \right) = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão glicina}} \times 2 \times F \quad (3.16)$$

Sendo:

F = Fator de diluição da cerveja ou do mosto

#### 4.5.7 Amargor

O amargor foi determinado pelo método Internacional de Unidade de Amargor (Bitterness Units, BU) da ASBC (2009). Foram transferidos 10 mL de amostra de cerveja resfriada (10 °C) e gaseificada, com uma gota de álcool octílico, para um tubo de centrífuga de 50 mL. Foi adicionado às amostras 1 mL de ácido clorídrico 3 N e 20 mL de iso-octano (2,2,4 – Trimetilpentano). Realizou-se a extração sob agitação de 15 minutos em plataforma horizontal (Ratek - ERPM4). Em seguida, as amostras foram centrifugadas para a separação de fases e coletou-se a camada superior de iso-octano, e realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda 275 nm. Para o branco, foi utilizado iso-octano com uma gota de álcool octílico. O amargor foi calculado segundo a fórmula:

$$\text{Amargor, BU} = A \times 50 \quad (3.17)$$

Sendo:

A = Absorbância no comprimento de onda 275 nm

#### 4.5.8 Glúten

A análise do glúten foi realizada utilizando o método da AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*, 2005). A técnica é um ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA*) competitivo, método utilizado para analisar glúten de alimentos fermentados e hidrolisados (R-BIOPHARM, 2006).

O procedimento fundamenta-se na reação antígeno-anticorpo. Foi utilizada uma placa de microtitulação com uma película de gliadina, que atua como antígeno, e adicionou-se padrões (hidrolisado de uma mistura de trigo, centeio e cevada) e soluções de amostra aos poços dessa placa, que também atuam como antígenos. Em seguida, adicionou-se o anticorpo (conjugado enzimático) e encubou-se por 30 minutos. Nessa etapa, gliadinas livres (amostra) e imobilizadas (placa) competem pelos sítios ativos do anticorpo. O líquido foi então inteiramente retirado dos poços, para remoção de qualquer conjugado não ligado à placa. Uma solução de lavagem foi adicionada e retirada duas vezes. Um substrato/cromógeno (Red Chromogen Pro) foi acrescentado e encubado por 10 minutos no escuro. Os conjugados enzimáticos ligados à placa convertem o cromógeno em um produto azul, e após 10 minutos, com a adição de uma solução de parada, a cor muda de azul para amarelo. Após 10 minutos da adição da solução de parada, mede-se a concentração de glúten por espectrofotômetro no comprimento de onda 450 nm. A absorvância é inversamente proporcional à concentração de glúten na amostra.

#### 4.5.9 Amido resistente

A análise do amido resistente aplicou o método da AOAC (2010). A técnica é um ensaio *in vitro*, que simula a ação da  $\alpha$ -amilase e da amiloglicosidase, em presença de amido, no corpo humano (MEGAZYME, 2011).

O procedimento iniciou-se em um banho agitado com  $\alpha$ -amilase pancreática e amiloglicosidase por 16 horas a 37 °C, durante o qual amido não resistente é solubilizado e hidrolisado pela ação das enzimas. Parou-se a reação com a adição de etanol e o amido resistente foi recuperado como *pellet* da centrifugação. O *pellet* foi lavado duas vezes com etanol (50%, v/v), novamente centrifugado e dissolvido em solução 2 M KOH por agitação vigorosa em um banho de gelo. Essa solução foi neutralizada com um tampão de acetato e o amido foi hidrolisado quantitativamente utilizando a enzima amiloglicosidase. A D-glicose do hidrolisado foi medida aplicando glicose oxidase/peroxidase (reagente GOD-POD) e realizando a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda 510 nm. O resultado corresponde à medida de amido resistente na amostra. O amido não resistente pode ser determinado coletando o sobrenadante e os líquidos das lavagens, ajustando o volume para 100 mL e medindo o teor de D-glicose utilizando o reagente GOD-POD.

#### 4.5.10 Atividade antioxidante e equivalência em vitamina C

A metodologia para medir a atividade antioxidante da cerveja foi a mesma de Zhao et al. (2010), que consiste em elaborar uma solução de DPPH  $6 \times 10^{-6}$  mol/L em etanol 50%, adicionar 2,9 mL dessa solução em 0,1 mL de cerveja e medir a absorbância a 517 nm em espectrofotômetro UV-Visível após 60 minutos. Para preparação de uma amostra para o controle da reação, adicionou-se 2,9 mL de solução de DPPH em 0,1 mL de água destilada, que também teve a absorbância medida a 517 nm após 60 minutos. O percentual de inibição foi calculado conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Percentual de Inibição, \%} = \left( \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \times 100 \quad (3.18)$$

Sendo:

$A_{\text{Controle}}$  = Absorbância do controle

$A_{\text{Amostra}}$  = Absorbância da amostra

Adicionalmente, para a padronização de valores, uma curva de calibração foi elaborada, em função do percentual de inibição e da concentração de ácido ascórbico (Vitamina C), a fim de se expressar os resultados em concentração equivalente de ácido ascórbico.

#### 4.5.11 Fenólicos totais e equivalência em ácido gálico

Os fenólicos totais da cerveja foram medidos de acordo com Zhao et al. (2010). A análise é baseada no método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, em que 0,5 mL de cerveja diluída 2 vezes foi adicionada a 2,5 mL de reagente fenólico de Folin-Ciocalteu diluído 10 vezes e deixou-se reagir por 5 minutos. Em seguida, 2 mL de solução 7,5% de carbonato de sódio foi adicionado e o volume foi completado com água destilada até 10 mL. Após 1 hora de reação, mediu-se a absorbância a 760 nm. O valor medido foi comparado com a curva de calibração de ácido gálico e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente em ácido gálico por litro de cerveja.

#### 4.5.12 Flavonoides totais e equivalência em quercetina

A medição dos flavonoides totais nas cervejas foi baseada no método de Hosu et al. (2014), em que amostras de vinho tiveram a concentração de flavonoides totais apuradas. Brevemente, adicionou-se

uma solução de  $\text{AlCl}_3$  (25 g/L) e uma solução de  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (100 g/L) às amostras, aguardou-se a reação por 15 minutos e mediu-se a absorbância em espectrofotômetro UV-Visível no comprimento de onda 430 nm. O valor medido foi comparado com a curva de calibração de quercetina e os resultados foram expressos em miligramas de equivalente em quercetina por litro de cerveja.

#### 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi utilizado o *software* Excel (Microsoft Corporation, 2013) com a ferramenta *action* (suplemento de análises estatísticas integrado ao Excel), para avaliar os resultados por meio de análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERÍSTICAS DAS MATÉRIAS-PRIMAS

#### 5.1.1 Temperatura de gelatinização

A temperatura e o calor absorvido devido à gelatinização, fenômeno endotérmico, podem ser observados utilizando DSC. A vantagem de utilizar esse aparelho é que este permite um controle preciso da temperatura enquanto mantém a amostra em um sistema fisicamente fechado. Os dados de tempo, temperatura da amostra e fluxo de calor, além de um gráfico de Temperatura vs. Fluxo de calor, foram obtidos e compilados utilizando o *software* Pyris DSC. A partir dos dados de temperatura da amostra e de fluxo de calor, pôde-se observar a temperatura de início, pico e fim da gelatinização, que possibilitou melhor planejamento do processo e comparação com dados da literatura. O gráfico de Temperatura vs. Fluxo de calor mostrou um pico endotérmico, sendo que a área desse pico equivale à variação da entalpia do fenômeno de gelatinização ( $\Delta H$ ), que foi calculada pelo programa. Os resultados de calorimetria exploratória do trigo sarraceno e da mandioca estão representados na Tabela 1 e os gráficos de Temperatura vs. Fluxo de calor estão representados nas Figuras 14 e 15.

Tabela 1 - Propriedades térmicas do trigo sarraceno e da mandioca IAC 576-70 (valores médios  $\pm$  desvio padrão, n= 3 repetições) medidas por DSC (Calorimetria Exploratória Diferencial)

Matéria-prima	T <sub>i</sub> (° C)	T <sub>p</sub> (° C)	T <sub>f</sub> (° C)	Vel. de Aquecimento (° C/min)	$\Delta H$ (J/g)
Trigo Sarraceno	58,92 $\pm$ 0,35	63,04 $\pm$ 0,11	70,25 $\pm$ 0,82	5	2,5977 $\pm$ 0,1261
Mandioca	51,44 $\pm$ 2,03	58,04 $\pm$ 0,16	73,04 $\pm$ 1,47	5	4,0390 $\pm$ 0,0716

T<sub>i</sub> = temperatura de início de gelatinização, T<sub>p</sub> = temperatura de pico de gelatinização, T<sub>f</sub> = temperatura de fim da gelatinização

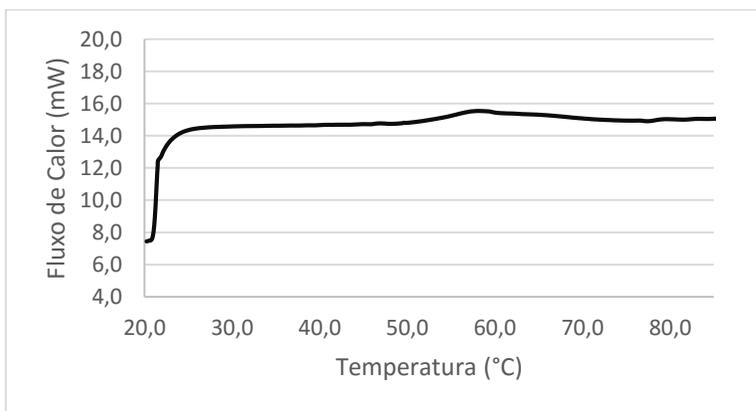
Annemüller e Manger (2013) reportaram faixas de temperatura de gelatinização (T<sub>i</sub> – T<sub>f</sub>) de 63-80 °C e Rolland-Sabaté et al. (2013) encontraram resultados de 56,1 – 72,0 °C para a mandioca. Wolter et al. (2013) reportaram dados de faixas de temperatura de gelatinização de 59-72 °C para o trigo sarraceno. Wijngaard e Arendt (2006) reportaram um

pico de gelatinização ( $T_p$ ) de 67 °C e Phiarais et al. (2010) de 65,4 °C, também para o trigo sarraceno.

Avaliando resultados da literatura e comparando o pico endotérmico da Figura 14 (mandioca) com o pico da Figura 15 (malte de trigo sarraceno), observa-se que o primeiro ficou extenso. Segundo resultados de Garcia et al. (1996), isso significa que uma proporção de água maior poderia ter sido aplicada (utilizou-se 2:1).

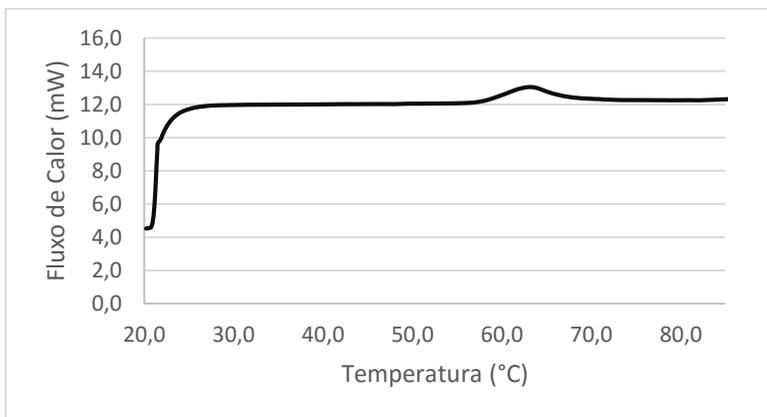
As faixas de temperaturas de gelatinização encontrados na literatura para a mandioca foram amplas, diferentes entre si e diferentes dos resultados desse estudo, o que pode ser justificado pela existência de muitos genótipos naturais ou modificados pelas técnicas de melhoramento das plantas, fato que não ocorre com o trigo sarraceno. Genótipos de mandioca com baixíssimos teores de amilopectina, por exemplo, apresentam temperaturas de gelatinização maiores (CEBALLOS et al., 2007). Além disso, plantios realizados em épocas secas geram uma multiplicidade de picos na varredura, e irrigação gera uma gelatinização mais fácil (DEFLOOR, 1998 e CHATAKANONDA, 2003).

Figura 14 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do genótipo de mandioca IAC-576-70.



Os resultados de temperatura de gelatinização observados foram confirmados durante a brassagem, em que se observou um aumento acentuado da viscosidade do mosto quando a temperatura se aproximava de 60 °C, sendo necessária a adição imediata da enzima liquidificante ( $\alpha$ -amilase termorresistente) para diminuir a viscosidade do mosto.

Figura 15 - Calorimetria exploratória diferencial (DSC) do Trigo Sarraceno.



As análises de Eriksson (2012), utilizando RVA (*Rapid Visco Analyzer*), mostraram como o amido de diversas espécies de farinha de cevada reagem com água aquecida enquanto agitado. Foi comprovado que durante a gelatinização ocorre um aumento acentuado de viscosidade, que atinge um pico durante o aquecimento. É muito comum em grandes cervejarias a utilização de adjuntos não maltados, como as matérias-primas utilizadas no presente projeto. Nesses casos, se as enzimas comerciais não forem aplicadas corretamente, pode ocorrer um aumento descontrolado da viscosidade do mosto, impossibilitando agitação e bombeamento, o que acarreta a perda do lote e danos nos equipamentos. Os resultados obtidos pela DSC, portanto, mostraram-se essenciais não só para o planejamento da rampa de temperatura da mosturação, mas também para prevenção de possíveis problemas no processo.

### 5.1.2 Teor de extrato

Os resultados de extrato permitiram uma correta elaboração da formulação e boas estimativas das propriedades físico-químicas, como o teor alcoólico e densidade relativa do mosto e da cerveja. A Tabela 2 mostra os resultados de extrato das matérias-primas utilizadas para elaboração das cervejas experimentais.

Tabela 2 - Umidade, densidade relativa e extrato (valores médios  $\pm$  desvio padrão, n= 3 repetições) de amostras de cevada 6 RW e trigo sarraceno moídos finamente e de farinha genótipo de mandioca IAC-576-70.

Matéria-prima	Umidade, % g/g	Densidade relativa*	Extrato total, % g/g	Extrato da Amostra, % g/g	Extrato da Amostra em base seca, % g/g
Cevada 6 RW	5,25 $\pm$ 0,08	1,0360 $\pm$ 0	80,4 $\pm$ 0	-	84,8 $\pm$ 0
Trigo Sarraceno	11,26 $\pm$ 0,14	1,0349 $\pm$ 0,0001	77,4 $\pm$ 0,2	73,7 $\pm$ 0,4	83,0 $\pm$ 0,5
Mandioca	5,46 $\pm$ 0,04	1,0380 $\pm$ 0,0002	84,6 $\pm$ 0,3	91,0 $\pm$ 0,9	96,2 $\pm$ 0,9

\* Densidade medida com amostra a 20 ° C em relação à densidade da água a 20 ° C

A avaliação da umidade dos grãos é de fundamental importância, uma vez que possibilita a comparação de valores com a literatura e elaboração de formulações em uma mesma base de cálculo.

Annemüller e Manger (2013) reportaram resultados médios de extrato de 87-97% em base seca para a mandioca e Asante (2008) observou que densidades relativas de mostos cervejeiros aumentam quanto maior for a proporção de mandioca aplicada, o que sugere que o extrato da mandioca é maior do que o da cevada, confirmando os resultados obtidos.

Wijngaard e Arendt (2006) apresentaram resultados de 65,9-72,7% de extrato total para o trigo sarraceno. Phiarais et al. (2010) obtiveram o resultado de 61,9% de extrato em base seca para o trigo sarraceno.

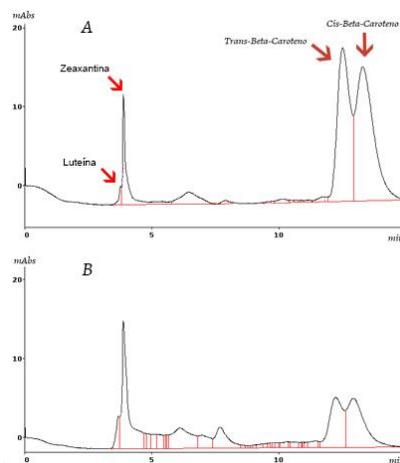
Os resultados encontrados para o trigo sarraceno mostraram-se superiores aos resultados previamente reportados na literatura, indicando influência dos diferentes locais de plantio, época de colheita da matéria-prima e especialmente qualidade da maltagem e umidade do grão, que no presente caso, encontra-se próxima ao limite que a análise abrange (<12%). Já os dados apurados para a mandioca mostraram-se próximos aos da literatura.

### 5.1.3 Teor de carotenoides da farinha de mandioca IAC 576-70

O tempo de retenção de cada carotenoide foi estimado por curva elaborada utilizando compostos padrão puros. Os resultados foram confirmados adicionando uma pequena quantidade de cada um dos compostos padrão nas amostras de cerveja e verificando se os picos correspondentes a cada carotenoide apareciam nos mesmos tempos de retenção.

A Figura 16 ilustra os tempos de retenção típicos dos carotenoides luteína, zeaxantina, Cis e Trans- $\beta$ -caroteno da raiz fresca e da farinha de mandioca IAC 576-70.

Figura 16 - Comparação do perfil carotenóidico da raiz fresca (A) e da farinha (B) de mandioca IAC 576-70 obtido por CLAE 450 nm.



Comparando os gráficos A e B da Figura 16, percebe-se uma mudança no perfil carotenóidico da raiz fresca e da farinha obtida a partir da raiz fresca, especialmente quanto ao teor de Cis e Trans- $\beta$ -caroteno. Infere-se que o tratamento para produção de farinha resultou em uma degradação acentuada desses carotenoides, mas não afetou a concentração de luteína e zeaxantina da mesma forma.

Avaliando os gráficos, observa-se um discreto aumento na concentração de luteína e zeaxantina na farinha. Resultados de Kotíková et al. (2016), Updike e Schwartz (2013), Aparicio-Ruiz et al. (2011) e Henry et al. (1998), mostraram que o carotenoide com maior estabilidade térmica foi a luteína, em relação aos carotenoides licopeno,  $\beta$ -criptoxantina, cis e trans- $\beta$ -caroteno. Adicionalmente, em estudo de Updike e Schwartz (2013), foi observado que após o processamento térmico houve um aumento no teor de luteína, por grama de massa seca, de 42, 26, 5 e 6% em ervilhas, brócolis, espinafre e milho, respectivamente. Hart e Scott (1995) demonstraram que o espinafre apresentou um aumento na concentração de luteína após ser cozido. Burgos et al. (2012), que avaliaram sete variedades de batatas quanto à

concentração de carotenoides antes e depois do cozimento, observaram que três variedades não tiveram mudança significativa, duas apresentaram aumento e duas apresentaram diminuição na concentração de zeaxantina após o cozimento. Nesse contexto, conclui-se que diferentes variedades de um tubérculo, fruto ou planta pode apresentar diferenças importantes quanto à retenção de carotenoides. No presente projeto, foi observado um leve aumento na concentração de zeaxantina, tal como ocorreu com a luteína.

Possíveis causas para o aumento da concentração de luteína, zeaxantina e outros carotenoides em vegetais processados, é a inativação de enzimas que oxidam carotenoides e/ou aumento da eficiência de extração devido à ruptura de complexos carotenoide-proteína (UPDIKE e SCHWARTZ, 2013).

A Tabela 3 mostra os resultados de concentração dos carotenoides majoritários, luteína, zeaxantina, Cis e Trans- $\beta$ -caroteno e dos carotenoides totais da farinha de mandioca IAC 576-70 e do malte de trigo sarraceno.

Tabela 3 - Concentração média\* ( $\mu\text{g/g} \pm$  desvio padrão) de carotenoides totais\*\* e luteína, zeaxantina, cis- $\beta$ -caroteno e trans- $\beta$ -caroteno em amostras de farinha de mandioca e malte de trigo sarraceno moído, determinados por CLAE.

Analito	Luteína	Zeaxantina	Trans - $\beta$ - Caroteno	Cis - $\beta$ - Caroteno	Total***
Farinha de Mandioca	0,39 $\pm$ 0,03	2,76 $\pm$ 0,07	14,79 $\pm$ 1,06	20,18 $\pm$ 0,88	41,71 $\pm$ 0,04
Malte de Trigo Sarraceno	12,90 $\pm$ 1,58	3,93 $\pm$ 1,07	3,56 $\pm$ 1,00	12,57 $\pm$ 1,81	41,68 $\pm$ 0,52

\* Média de três amostras  $\pm$  SD (desvio padrão da média)

\*\* A unidade da concentração é de  $\mu\text{g}$  de carotenoide por g de massa de matéria-prima seca

\*\*\* Os carotenoides totais foram apurados por CLAE através da soma das concentrações de cada carotenoide presente

Moresco (2013), que avaliou as concentrações de diferentes carotenoides na raiz fresca da mandioca IAC 576-70, apresentou resultados médios de 20,68  $\mu\text{g}$  por grama de raiz fresca para carotenoides totais. Para fins de comparação com os dados do presente estudo, foi estimada a concentração de carotenoides por massa seca, utilizando dados de Oliveira e Moraes (2009), que mediram o teor de umidade da mandioca IAC 576-70 em diversos tempos de colheita. A umidade média da mandioca IAC 576-70 encontrada foi de 63,6%, portanto, a concentração

de carotenoides totais estimada foi de 56,81  $\mu\text{g}$  por grama de massa seca. A partir dos dados estimados supracitados e dos resultados da Tabela 3, conclui-se que houve uma deterioração de 26,6% dos carotenoides totais ao transformar a raiz fresca em farinha de mandioca, que pode ser atribuída exclusivamente aos carotenoides Cis e Trans- $\beta$ -caroteno, visto que os demais carotenoides se mantiveram em concentração próxima ou até superior em relação à raiz fresca.

Segundo Thakkar et al. (2009), que verificaram a retenção do  $\beta$ -caroteno na mandioca, esse é destruído por calor, luz e oxigênio, ou uma combinação dos três fatores. O estudo de Chávez et al. (2005) avaliou a retenção de  $\beta$ -caroteno em raízes de mandioca submetidas à secagem em estufa (60 °C/24 horas), secagem ao sol (2-3 dias) e secagem à sombra (6-7 dias). O processo de secagem na estufa permitiu a retenção de maiores conteúdos de  $\beta$ -caroteno (71,9%), seguido de secagem à sombra (59,2%) e secagem ao sol (37,9%). A drástica redução na retenção de  $\beta$ -caroteno na secagem ao sol, comparativamente à secagem à sombra, sugere um efeito significativo prejudicial da luz na estabilidade daquele pigmento. Os resultados de Chávez et al. (2005) quanto à redução do teor de carotenoides por secagem na estufa, são condizentes com os resultados de deterioração estimados nesse estudo.

Ao aumentar a área superficial de uma fruta ou vegetal rico em  $\beta$ -caroteno, cortando, amassando ou moendo, e secando uma fruta ou vegetal, em forno ou sol, expõe a matriz alimentícia à luz e oxigênio. Assando, cozinhando ou fervendo o alimento, expõe o  $\beta$ -caroteno a altas temperaturas. Todos esses processos são muito comuns na indústria alimentícia e foram aplicados para elaboração da farinha de mandioca a partir da raiz fresca. Consequentemente, o processamento de vegetais e tubérculos está associado à diminuição desses carotenoides no produto final.

Tuan et al. (2013), ao avaliar a influência da germinação na concentração de carotenoides da variedade de trigo sarraceno indiano (*Fagopyrum tataricum*), observaram que a maior parte dos carotenoides detectados nesse pseudocereal foram luteína e o  $\beta$ -caroteno. A concentração de carotenoides totais da semente de trigo sarraceno variou de 34,09-44,18  $\mu\text{g/g}$ , de luteína variou de 22,81-28,83  $\mu\text{g/g}$  e de  $\beta$ -caroteno variou de 8,39-11,61  $\mu\text{g/g}$  de matéria seca conforme a variedade avaliada. Os valores da Tabela 3, referentes ao malte de trigo sarraceno, apresentaram resultados superiores, mas relativamente próximos aos valores da semente de trigo sarraceno. Essa diferença pode ser justificada pelo processo de maltagem, que envolve a germinação do grão, que

umenta a concentração de carotenoides (TUAN et al., 2013), e pela diferença das variedades dos grãos.

A fim de se obter mais dados da funcionalidade de um alimento rico em carotenoides, é interessante o cálculo da atividade equivalente de retinol (RAE), utilizando a fórmula 3.8, uma vez que um componente rico em trans- $\beta$ -caroteno, por exemplo, apresentará maior atividade provitamina A, portanto, terá maiores propriedades bioativas do que um componente rico em trans- $\alpha$ -caroteno, mesmo que ambos apresentem o mesmo valor de carotenoides totais.

Segundo dados da FAO/WHO (2001) a recomendação de ingestão diária de vitamina A é em média de 550  $\mu\text{g}$  de RAE para adultos. Cada RAE corresponde à atividade equivalente de 1  $\mu\text{g}$  de retinol ou 6  $\mu\text{g}$  de  $\beta$ -caroteno. O consumo de 100 g de farinha de mandioca de IAC 576-70 supre 39% dessa necessidade diária, enquanto que para obter o mesmo benefício a partir do trigo sarraceno, são necessários 266 g. Portanto, a mandioca IAC 576-70 apresenta atividade provitamina A apreciável, e mesmo após passar por um tratamento de moagem e secagem, continuou apresentando valores de RAE superiores aos do malte de trigo sarraceno, também conhecido por seu teor de carotenoides precursores de vitamina A.

## 5.2. BRASSAGEM E FERMENTAÇÃO

A Tabela 4 mostra a eficiência de brassagem obtida para cada uma das cervejas experimentais. Essa eficiência indica o percentual da massa de grãos utilizada que efetivamente é extraída para o mosto em forma de açúcares, substâncias inorgânicas, proteínas e outros.

Tabela 4 - Eficiência de Brassagem das Cervejas Padrão, BC e AR (médias  $\pm$  desvio padrão, n= 3)

	Rendimento de Brassagem Médio
Cerveja Padrão	65,06 $\pm$ 1,05%
Cerveja BC	62,68 $\pm$ 0,79%
Cerveja AR	63,29 $\pm$ 0,19%

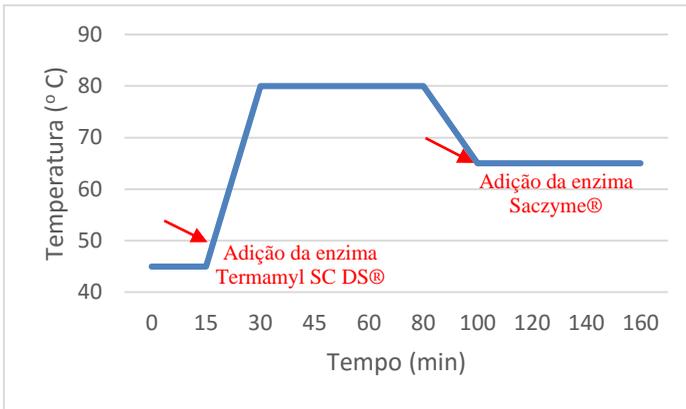
Os rendimentos encontrados ficaram relativamente baixos, se comparados com a eficiência média de brassagem utilizando malte de cevada, que é de 74-79% (KUNZE, 2010). Fatores que afetam a eficiência da brassagem incluem umidade e qualidade da maltagem dos grãos,

equipamento utilizado, operação e rampas de temperatura, lavagem dos grãos e aspersão durante a extração. Phiarais et al. (2010) encontraram eficiência de brassagem de 54,5% em uma cerveja elaborada utilizando 100% de trigo sarraceno, justificando o baixo valor pela ausência de aspersão em seu processo. Os rendimentos das cervejas experimentais do presente estudo foram superiores ao rendimento de Phiarais et al. (2010) devido à satisfatória aplicação da aspersão contínua, mas ficou abaixo da média das brasagens realizadas com malte de cevada. A aplicação de outros tipos de enzimas comerciais, além das aplicadas, poderia ter aumentado a eficiência, pois os adjuntos aplicados possuem deficiência em outras enzimas do processo cervejeiro. Segundo Phiarais e Arendt (2008), por exemplo, a adição de amiloglicosidase aumenta a eficiência de brassagem e fermentabilidade de uma cerveja elaborada com 100% de trigo sarraceno.

O pH médio dos mostos das cervejas foi de 5,8, que segundo Kunze (2010), encontra-se no limite máximo do que normalmente se encontra em cervejarias, mas que ainda permite a atuação adequada das enzimas amilolíticas. Asante (2008) constatou que o pH de uma cerveja com maior proporção de mandioca tende a ser maior do que cervejas de cevada. Além disso, Wijngaard e Arendt (2006) observaram que em uma cerveja elaborada com 100% de trigo sarraceno, valores de pH entre 5,9-6 foram medidos durante a brassagem. Portanto, os valores relativamente altos de pH encontrados, devem-se a características específicas das matérias-primas.

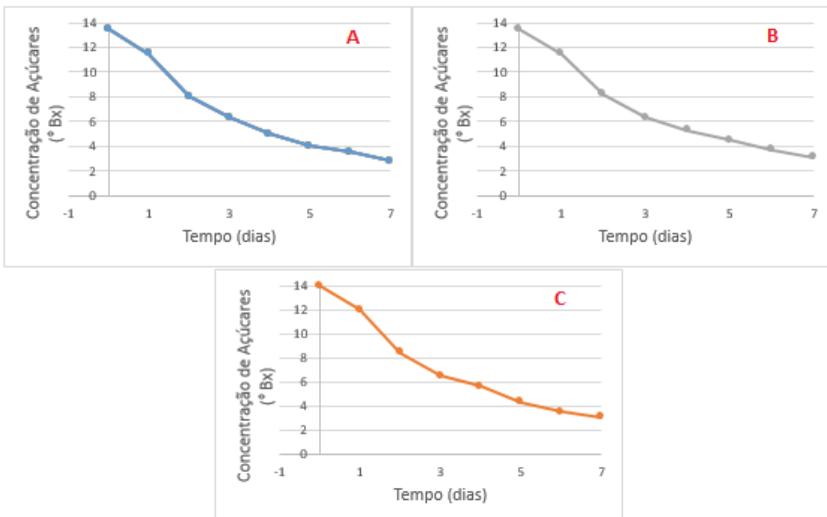
A rampa de aquecimento da etapa de mosturação, que pode ser visualizada na Figura 17, foi planejada conforme os resultados das temperaturas de gelatinização e teor de FAN das matérias-primas. Além disso, levou-se em consideração as temperaturas ideais das enzimas comerciais  $\alpha$ -amilase termorresistente e  $\beta$ -amilase. Portanto, a rampa teve início com um descanso proteico de 15 minutos a 45 °C para possibilitar a ação de proteases para formação de FAN, seguida de um aumento até 80 °C, sendo que quando a temperatura aproximou-se da temperatura de gelatinização do amido das matérias-primas (50 °C), foi adicionada a enzima Termamyl SC DS® para evitar aumento excessivo da viscosidade do mosto e possíveis problemas processuais em decorrência. A temperatura foi mantida em 80 °C por 50 minutos, para atuação da  $\alpha$ -amilase, e reduziu-se a temperatura para 65 °C, permanecendo assim por 60 minutos para a atuação da  $\beta$ -amilase.

Figura 17 - Rampa de Temperatura aplicada na mosturação com os momentos de adição das enzimas  $\alpha$ -amilase termorresistente (Termamyl SC DS ®) e  $\beta$ -amilase (Saczyme ®).



Com relação ao desenvolvimento da fermentação, a Figura 18 ilustra o decaimento da concentração de açúcares das cervejas experimentais durante a fermentação.

Figura 18 - Perfis de Fermentação da Cerveja padrão (A), Cerveja BC (B) e Cerveja AR (C).



Avaliando os gráficos da figura 18, que tiveram comportamento semelhante, observa-se um pequeno *lag* no primeiro dia, uma queda brusca na concentração de açúcares nos dias seguintes, seguida de uma finalização relativamente lenta, sendo que a atenuação máxima (2,56 °Bx) foi alcançada em sete dias.

O grau de fermentação mede o percentual do açúcar do mosto que é convertido em álcool. Uma cerveja doce, por exemplo, tem maior concentração de açúcar residual e menor grau de fermentação. O grau de fermentação foi de 63,7% para a cerveja padrão, 64,1% para a cerveja BC e 66,8% para a cerveja AR. O grau de fermentação de uma cerveja de cevada normalmente apresenta valores de 60-70% (HARDWICK, 1995), o que indica que a fermentação ocorreu normalmente em todas as cervejas.

## 5.3 CARACTERÍSTICAS DO PRODUTO FINAL

### 5.3.1 Propriedades físico-químicas do mosto e das cervejas

#### 5.3.1.1 Densidade relativa, teor alcoólico e extrato residual

A medida da densidade relativa é fundamental para diversas análises de cerveja. Mediu-se a densidade relativa do mosto para averiguar o extrato, do destilado para análise do teor alcoólico e de extrato residual. Mediu-se ainda a densidade relativa da própria cerveja, para determinar o fim da fermentação. Os resultados podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Densidade relativa dos mostos e das cervejas, teor alcoólico e extrato residual (valores médios  $\pm$  desvio padrão, n = 3 repetições) de amostras de cerveja padrão, BC e AR.

	Densidade Relativa do Mosto* (20 °C)	Densidade Relativa da Cerveja** (20 °C)	Densidade Relativa da Cerveja* (20 °C)	Teor Alcoólico (% vol.)	Extrato Residual (%)
Cerveja Padrão	1,056 $\pm$ 0,001	1,0131 $\pm$ 0	1,013 $\pm$ 0	5,57 $\pm$ 0,04	5,23 $\pm$ 0,01
Cerveja BC	1,052 $\pm$ 0,001	1,0112 $\pm$ 0	1,012 $\pm$ 0	5,36 $\pm$ 0,06	4,89 $\pm$ 0,14
Cerveja AR	1,052 $\pm$ 0,001	1,0131 $\pm$ 0	1,013 $\pm$ 0	5,87 $\pm$ 0,09	4,81 $\pm$ 0,09

\* Densidade medida utilizando hidrômetro e refratômetro

\*\* Densidade medida utilizando picnômetro

Os resultados finais de densidade relativa das cervejas experimentais também são encontrados nos estilos *weissbier*, *witbier*, *cream ale*, cervejas *pilsen* tcheca e alemã, entre outros.

O processo cervejeiro está sujeito a muitas variações, como diâmetro do grão moído, eficiência de extração, velocidade de evaporação, quantidade de *trüb* que termina no fermentador e a própria levedura, que é um organismo vivo muito susceptível a mudanças conforme a temperatura e pressão. Portanto, pequenas variações entre as cervejas experimentais não puderam ser evitadas. A cerveja padrão, que apresentou a maior densidade relativa inicial, não ficou com o maior teor alcoólico, mas por outro lado, apresentou o maior extrato residual, que pode ser resultado de pequenas variações da temperatura de mosturação. Em relação ao teor alcoólico, vale ressaltar que foi comprovado que o consumo de 10-15 g de álcool por dia, equivalente a aproximadamente 250 mL das cervejas de mandioca e trigo sarraceno, diminui a mortalidade por doenças do coração, em comparação a quem não bebe ou a quem bebe excessivamente (GERHAUSER, 2005). Além disso, Saura-Calixto et al. (2009) associaram os efeitos positivos do consumo de cerveja não apenas à presença de fenólicos e compostos antioxidantes, mas também ao efeito conjunto dessas substâncias e o etanol.

O consumo moderado de álcool pode auxiliar na prevenção de doenças do coração, independentemente do tipo de bebida alcoólica consumida (KLATSKY et al., 2005), mas pesquisas envolvendo o vinho tinto, e mais recentemente a cerveja, sugerem que essas bebidas têm um efeito maior de proteção cardíaca, em relação às bebidas destiladas, que não possuem polifenóis em sua composição (SILVA et al., 2016). Isso sugere que álcool não só confere efeitos benéficos *per se*, mas também tem atuação indireta no aumento da absorção de compostos fenólicos, que pode ser atribuída à maior solubilidade desses compostos em etanol (SAURA-CALIXTO et al., 2009).

### 5.3.1.2 Cor

Todas as cervejas experimentais foram filtradas duas vezes e centrifugadas, para ficarem livres de turbidez, que é prejudicial nessa análise. Em três experimentos distintos, a cerveja padrão apresentou a cor equivalente a  $2,5 \pm 0$  SRM, a cerveja BC a  $9,2 \pm 0,2$  SRM e a cerveja AR a  $7,1 \pm 0,1$  SRM.

Dados do fabricante do malte de trigo sarraceno indicam que a cor do mosto pode variar de 2-7,6 SRM. Considerando que o mosto é

composto por aproximadamente 50% desse malte, assume-se que a cor da primeira cerveja foi conferida pelo malte de trigo sarraceno.

Conforme resultados reportados na tabela 6 do subitem 5.3.2.1, as cervejas BC e AR possuem maior concentração de carotenoides, em relação à cerveja padrão, e provavelmente tiveram suas cores intensificadas pela cor amarela da mandioca IAC 576-70, responsável por essa diferença.

### 5.3.1.3 Turbidez

A cerveja padrão visualmente apresentou a menor turbidez, apresentando valor aproximadamente de 400 FTU. A cerveja BC apresentou turbidez intermediária, aproximadamente de 600 FTU. A cerveja AR nitidamente mostrou-se a mais turva, com valor acima de 1000 FTU. A diferença de turbidez entre a cerveja padrão e a cerveja AR pode ser visualizada na Figura 19.

Figura 19 - Comparação de turbidez entre as amostras da cerveja padrão (esquerda) e da cerveja AR (direita).



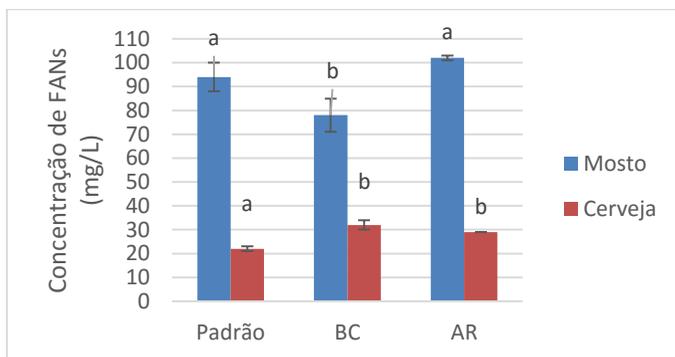
A maior turbidez da cerveja AR pode ser facilmente atribuída à maior concentração de amido resistente em suspensão. Quanto ao fato da cerveja padrão ser a menos turva, pode ser atribuído a sua concentração

inferior de flavonoides, portanto, possui menos flavonoides oligoméricos, que são conhecidos por se ligarem a complexos solúveis que geram turbidez (CALLEMIEN e COLLIN, 2007).

### 5.3.1.4 Concentração de *Free Amino Nitrogen* (FAN)

Na Figura 20 estão apresentados os resultados da análise de FAN para os mostos e as cervejas produzidas.

Figura 20 - Concentração de FAN nas cervejas e mostos padrão, BC e AR. Valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



Wijngaard e Arendt (2008) encontraram concentrações de FAN no mosto de trigo sarraceno de 95-159 mg/L, que variava conforme a temperatura de infusão aplicada, sendo que maiores temperaturas de infusão acarretaram em menores concentração de FAN. Contreras et al. (2013) encontraram valores de FAN no mosto de sorgo e de milho de 65,93-79,36 e de 101,67 mg/L, respectivamente. Os resultados obtidos no presente estudo foram semelhantes aos valores da literatura supracitados, provavelmente por se tratarem todos de adjuntos diferentes da cevada.

Annemüller et al. (2011) recomendam concentrações iniciais de 150 – 200 mg de FAN/L no mosto e sugerem um consumo de 100 – 140 mg de FAN/L durante a fermentação, além disso, indicam um valor residual de 20 – 40 mg de FAN/L. Valores residuais nessa faixa significam que os FAN foram totalmente consumidos, já que usualmente valores residuais não podem ser consumidos pela levedura. Caso valores

residuais maiores sejam encontrados, significa que houve deficiência de outros nutrientes e podem ter ocorrido problemas durante a fermentação.

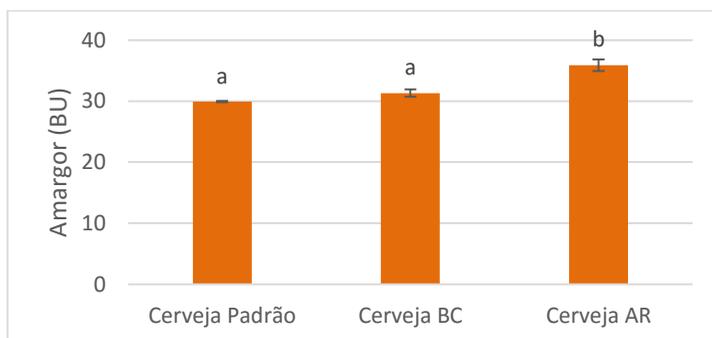
Baixos valores de FAN nas cervejas experimentais eram esperados, devido à utilização de grãos diferentes da cevada. Foi seguida, portanto, uma das recomendações de Annemüller e Manger (2013), de aumentar o teor de FAN realizando um descanso proteico de 15 minutos. A desvantagem de aplicar esse método é que muitas vezes a quebra de proteínas de alto peso molecular acaba sendo prejudicial à espuma, que tem sua retenção reduzida devido à diminuição do corpo/viscosidade da cerveja. Apesar dessa precaução, os resultados encontrados de FAN ficaram abaixo do recomendado. Por outro lado, os FAN foram inteiramente consumidos e em uma quantidade próxima da recomendada.

A fermentação de todas as cervejas foi rápida, apresentou atenuação satisfatória e valores residuais de FAN dentro da normalidade. Isso sugere não só que a concentração de nitrogênio assimilável foi suficiente, mas também que a fermentação transcorreu normalmente, sem mostrar deficiência em outros nutrientes.

#### 5.3.1.5 Amargor

Valores absolutos, em BU, foram medidos em todas as cervejas experimentais e podem ser observados na Figura 21.

Figura 21 - Amargor das cervejas padrão, BC e AR. Valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes ( $n=3$ ). Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.



O método espectrofotométrico-UV utilizado, que mede o amargor na unidade internacional BU (*Bitterness Unit*), expressa o sabor amargo

de forma satisfatória, independentemente da idade do lúpulo (ASBC, 2009). Essa unidade internacional expressa a concentração de  $\alpha$ -ácidos amargos do lúpulo, dissolvidos e isomerizados durante a fervura, em ppm ou mg/L. O amargor é um atributo comum em todas as cervejas, é originário principalmente do lúpulo e varia de 5 até valores acima de 100 IBU.

Avaliando os resultados, percebe-se que houve uma diferença nos resultados de amargor das cervejas padrão e BC, em relação à cerveja AR. Foi observada uma turbidez excessiva durante a análise da cerveja AR e assumiu-se a hipótese de que o amido resistente foi o responsável pela interferência na absorbância. Não existem dados na literatura de amargor em cervejas contendo amido resistente para corroborar essa hipótese, mas existem limitações do método utilizado. Amostras contendo conservantes, por exemplo, como n-heptil e p-hidroxibenzoato, e possivelmente outros adjuntos cervejeiros e corantes, apresentam interferências que aumentam a absorbância no comprimento de onda aplicado. A possibilidade de substâncias diferentes dos compostos amargos absorverem em comprimentos de onda UV é ampla nesse método (ASBC, 2009). Portanto, a hipótese de que o amido resistente possa ter interferido na análise é razoável e provavelmente o amargor real da cerveja AR é próximo aos das cervejas padrão e BC.

Os valores de amargor encontrados para as cervejas experimentais, de aproximadamente 30 IBU (*International Bitterness Unit*), ficam acima da média do estilo *witbier*, de 10-20 IBU segundo o BJCP (*Beer Judge Certification Program*), ficando próximas aos estilos *doppelbock* e *german pilsner* (MOSHER, 2009). Vale ressaltar que a percepção do amargor é relativa, dependendo da densidade original da cerveja. Cervejas mais fortes e encorpadas com 15 IBU, por exemplo, podem parecer pouco amargas, enquanto que cervejas mais fracas com 15 IBU podem parecer excessivamente amargas.

### 5.3.2 Propriedades bioativas das cervejas

#### 5.3.2.1 Carotenoides

A Tabela 6 apresenta os resultados de concentração dos carotenoides nas cervejas experimentais, mostrando que não houve retenção alguma de  $\beta$ -caroteno.

Tabela 6 - Concentração média ( $\mu\text{g/mL} \pm$  desvio padrão) de luteína e zeaxantina\* em amostras\*\* de cerveja padrão, cerveja BC e cerveja AR.

Analito	Luteína	Zeaxantina
Cerveja Padrão	$2,98 \pm 0,59$	$3,34 \pm 0,68$
Cerveja BC	$6,16 \pm 0,56$	$3,59 \pm 0,39$
Cerveja AR	$6,09 \pm 0,26$	$3,44 \pm 0,14$

\* Determinado por CLAE (450 nm) e conteúdo de carotenoides calculados através da intensidade do pico de interesse;

\*\* Média de três amostras  $\pm$  SD (desvio padrão da média).

K'osambo et al. (1998), observaram que a extensão de perda do  $\beta$ -caroteno após a fervura por 30 minutos da batata doce variou de 14-59%. Ceballos et al. (2012) analisaram a retenção de carotenoides em raízes de seis clones de mandioca submetidas ao cozimento em água em ebulição. A média de retenção situou-se em torno de 86,6%, com amplitude de variação de 76 a 96,7% (base em peso seco). Resultados obtidos por Chávez et al. (2007), também com raízes submetidas ao processo de fervura por 30 minutos, apresentaram 55,7% de retenção, com amplitude de variação de 27,2 a 82,8% (base em peso seco). Esses dados mostram uma degradação relativamente branda de carotenoides em processos envolvendo cozimento de vegetais, mas nenhum dos casos estudados teve um tratamento tão agressivo quanto o processo cervejeiro, que envolve a aplicação de altas temperaturas durante horas, além de uma hora de fervura, uma semana de fermentação e uma semana de maturação. Levando isso em consideração e comparando os dados da Tabela 3 com os dados da Tabela 6, foi verificado neste trabalho, portanto, que o carotenoide  $\beta$ -caroteno não resiste ao processo cervejeiro completo.

As amostras não apresentaram picos correspondentes ao Cis e Trans- $\beta$ -caroteno, mas os picos de zeaxantina e luteína mostraram-se presentes, confirmando os dados da literatura previamente mencionados de que são os carotenoides mais estáveis. Não se pode afirmar que os resultados desse estudo contradizem os dados da literatura, uma vez que não existem estudos publicados sobre a retenção de carotenoides em cervejas desde a matéria-prima até o produto final, e vale ressaltar que o processo cervejeiro possui tratamentos térmicos mais agressivos do que os casos estudados.

Avaliando a Tabela 6, chama a atenção a diferença de concentração de luteína entre as cervejas elaboradas com a farinha de mandioca IAC

576-70 em relação à farinha de mandioca comercial, o que é muito positivo para promover as espécies geneticamente melhoradas, que tem possibilidade de trazer diversos benefícios à saúde, como a presença de carotenoides e outros compostos bioativos.

Apesar das cervejas não apresentarem  $\beta$ -caroteno, elas apresentaram quantidades apreciáveis de luteína e zeaxantina. A mácula lútea, ponto amarelo localizado próximo ao centro da retina do olho humano e com grande participação na visão de cores, contém a maior concentração encontrada no corpo desses carotenoides, que não são sintetizados por humanos e devem ser consumidos na dieta. Dados publicados indicam o papel da luteína e zeaxantina na redução do estresse foto-oxidativo da retina (LANDRUM e BONE, 2001). Corroborando com esses dados, estudos epidemiológicos mostraram que baixo consumo diário ou baixa concentração no plasma de luteína e zeaxantina estão associados à degeneração da mácula associada à idade (BONE et al., 2001). Adicionalmente, já foi sugerido que esses compostos têm efeitos bioativos potencializados quando associados ao  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico e outros antioxidantes (SEMBA, 2003), que também estão presentes na matriz complexa que é a cerveja.

Segundo Braun e Cohen (2007) uma ingestão diária de 6-20 mg de luteína e 2-5 mg de zeaxantina são recomendadas para prevenção de degeneração macular e 15 mg por semana de luteína são suficientes para melhorar a performance visual dos pacientes com catarata. Portanto, uma ingestão diária de 330 mL, equivalente a uma *longneck*, da cerveja BC ou da cerveja AR pode contribuir com aproximadamente 20% da luteína e 33% da zeaxantina necessárias para prevenção da degeneração macular.

Tendo isso em vista, o consumo da cerveja BC e AR não está relacionado ao consumo de carotenoides provitamina A, mas, por outro lado, essas cervejas contribuem com a ingestão diária recomendada de zeaxantina e luteína, carotenoides relacionadas à prevenção de doenças relacionadas à visão.

### 5.3.2.2 Glúten

A cerveja padrão apresentou um resultado de 5,1 ppm e a cerveja BC de 23 ppm. A cerveja AR não teve a concentração de glúten avaliada, pois sua única diferença em relação à cerveja BC foi uma adição de 100 g farinha de mandioca (menos de 2 % de adição extra de matéria-prima) durante a fervura, portanto, a concentração de glúten não deve ter uma diferença relevante entre essas cervejas. Tendo isso em vista, optou-se por

analisar apenas a cerveja padrão, que é o padrão de comparação, e a cerveja BC.

Avaliando os resultados com base na CODEX ALIMENTARIUS (2008), a cerveja padrão pode ser considerada naturalmente livre de glúten (<20 ppm ou mg/L) e a cerveja BC como contendo baixo teor de glúten (<100 ppm e  $\geq 20$  ppm). A mandioca e o trigo sarraceno são matérias-primas naturalmente livres de glúten (PHIARAIS e ARENDT, 2008), portanto, uma justificativa plausível para os valores ligeiramente acima do permitido da cerveja BC é uma contaminação cruzada. Tendo em vista que a cerveja padrão apresentou valores dentro do esperado, e a única diferença entre a cerveja padrão e a cerveja BC foi a farinha de mandioca utilizada, assume-se que a farinha ou a raiz de mandioca fresca utilizada na formulação da cerveja BC tenha tido algum contato com o glúten. Apesar disso, considerando que a legislação brasileira não define valores máximos e não adota oficialmente padrões internacionais, a interpretação de análise da cerveja BC considerou-a livre de glúten por estar próxima do valor limite permitido pela *Codex Alimentarius*.

Ambas as cervejas foram consideradas alimentos naturalmente livres de glúten, conforme laudos de análise (Anexos A e B). Dessa forma, os resultados indicam que as cervejas experimentais podem ser incorporadas em dietas livres de glúten, mas a cerveja BC deve ser consumida com cautela, sempre observando limites seguros de ingestão diária de glúten. Hischenhuber et al. (2006) e Ludvigsson et al. (2014) recomendam uma ingestão de 10 a 100 mg diários, enquanto Scherf et al. (2016) recomendam uma ingestão inferior a 20 mg diários.

Analisando os resultados de concentração de glúten em diversas cervejas comerciais de cevada e de trigo, avaliadas nos estudos de Comino et al. (2013) e de Zandycke (2013), valores médios de 179 mg/L e de 190 mg/L, respectivamente, foram encontrados. Os valores variaram de 24 mg/L, para uma *lager* americana comum, até 1602 mg/L para uma cerveja de trigo. Portanto, ao consumir 330 mL da cerveja padrão, da cerveja BC e de uma cerveja comercial são ingeridos aproximadamente 1,7 mg, 7,59 mg e 61 mg de glúten, respectivamente. A diferença de concentração de glúten entre as cervejas experimentais e comerciais, portanto, é bastante relevante. Levando em consideração as recomendações nutricionais de Scherf et al. (2016), as cervejas experimentais têm possibilidade de serem consumidas com moderação, não excedendo o limite máximo de ingestão de 20 mg diários.

A baixa ingestão do glúten é benéfica não só para quem tem a doença celíaca ou para quem tem sensibilidade ao glúten, mas também para pacientes de outras doenças crônicas e autoimunes, como psoríase,

artrite reumatoide e diabetes tipo 1 (GREEN, 2009; EL-CHAMMAS e DANNER, 2011; GAESSER et al., 2012).

### 5.3.2.3 Amido resistente

A cerveja padrão e a cerveja AR foram submetidas à análise de amido resistente, sendo que a cerveja padrão mostrou um resultado de 0,28g /100g (g de amido resistente/g de amostra de cerveja) e a cerveja AR de 0,74 g/100 g (g de amido resistente/g de amostra de cerveja). Os laudos de análise estão nos Anexos C e D.

A cerveja AR foi comparada apenas com a cerveja padrão, a fim de se verificar a diferença entre uma cerveja com adição da farinha e sem adição da farinha durante a fervura. Tanto a cerveja BC quanto a cerveja padrão não tiveram essa adição, portanto, optou-se por analisar apenas a cerveja padrão, elaborada justamente para fins de comparação.

Amido de tubérculos e raízes exibem um perfil de alta viscosidade e retrogradam com grande facilidade (CHARLES, 2016). Isso foi confirmado pela concentração apurada de amido resistente da cerveja AR, que apresentou resultados quase 3 vezes maiores do que a cerveja padrão. Essa diferença ocorreu devido à adição de apenas 100 g (correspondente a 1,7% mássico das matérias-primas) de mandioca nos últimos 15 minutos de fervura, que, seguida do resfriamento rápido do mosto, passando consequentemente por gelatinização e retrogradação, responsáveis pela formação de um gel de amido, que é resistente à digestão.

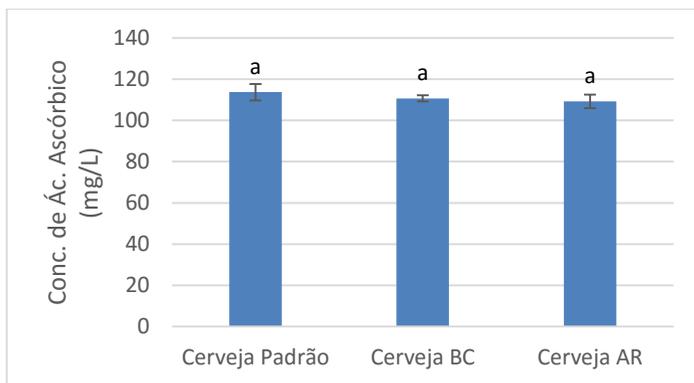
Baghurst et al. (1996) recomendam uma ingestão diária de 20 g de amido resistente para obter os benefícios para a microbiota intestinal. Portanto, a ingestão de 330 mL da cerveja AR pode fornecer mais de 10% da quantidade recomendada de amido resistente.

### 5.3.2.4 Atividade antioxidante e equivalência em vitamina C

Uma cerveja com alta atividade antioxidante é importante não só para a saúde de quem consome, mas também para a estabilidade do sabor, uma vez que a oxidação da cerveja é causada pela formação de trans-2-nonenal e outros aldeídos saturados e insaturados devido à oxidação de lipídeos (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Estão apresentados na Figura 22 os resultados de atividade antioxidante obtidos para as cervejas experimentais.

Figura 22 - Concentração equivalente de ácido ascórbico (vitamina C) das amostras de cerveja padrão, BC e AR, obtida a partir da avaliação da atividade antioxidante por Inibição do radical DPPH. Valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.



Os resultados de percentual de inibição para as cervejas funcionais desse estudo variaram de 68,6 - 75,7%, no entanto, a atividade antioxidante foi expressa em mg de equivalentes de ácido ascórbico (vitamina C) por litro, a partir de curva de calibração elaborada, para facilitar comparações com a literatura.

Os resultados de atividade antioxidante das cervejas experimentais mostram-se comparáveis com os de alguns sucos de frutas, consagrados como antioxidantes pelos altos teores de vitamina C. Kalusevic (2001), utilizando o método de inibição do radical DPPH, encontrou percentuais 64,25-70,14% para cervejas elaboradas com mel. Barberis et al. (2015) encontraram uma concentração de 3,07  $\mu\text{mol}$  ou 540,69 mg de equivalentes de ácido ascórbico por litro no suco de laranja e de 4,96  $\mu\text{mol}$  ou 873,56 mg de equivalentes de ácido ascórbico por litro de suco de mirtilo. Schlesier et al. (2002), que avaliaram a atividade antioxidante de sucos, encontraram resultados de 75,6 - 311,7 e de 75,4 - 83,8 mg de equivalentes de ácido ascórbico por litro, para suco de laranja e de tomate respectivamente.

O consumo de altas concentrações de ácido ascórbico, de 180 mg por dia, acarreta em apenas 20% de metabolização, enquanto que essa porcentagem muda para 90% com um consumo mais baixo (ZETLER et al., 1976). Gaumlich et al. (1997) estimaram um máximo *turnover*

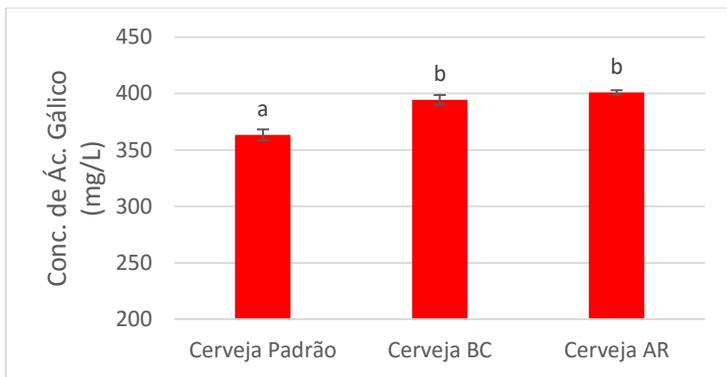
metabólico de 42 mg por dia, o que é consistente com o consumo diário recomendado por Kallner et al. (1981), de 40-50 mg por dia.

O consumo de 330 mL da cerveja padrão, BC ou AR confere aproximadamente 36 mg de equivalentes de ácido ascórbico. Nesse contexto, ainda que a atividade antioxidante das cervejas esteja abaixo de alguns sucos, ela ainda é alta o suficiente para contribuir com boa parte do consumo diário necessário para uma metabolização eficiente e considerável benefício funcional.

### 5.3.2.5 Fenólicos totais e equivalência em ácido gálico

O método de Folin-Ciocalteu é amplamente utilizado em vinícolas e recentemente vem sendo aplicado em análises de cervejas. Esse método tem a vantagem de responder de forma equivalente a diversos fenólicos, permitindo a comparação entre diferentes estilos de vinhos e cervejas. Os resultados de concentração de fenólicos totais estão representados na Figura 23, expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por litro.

Figura 23 - Concentração equivalente de ácido gálico das amostras de cerveja padrão, BC e AR, obtida a partir da avaliação de fenólicos totais. Valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes ( $n=3$ ). Letras distintas nas colunas de mesma cor representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.



Confrontando os resultados da cerveja padrão com as cervejas BC e AR, elaboradas com a mandioca IAC 576-70, percebe-se uma diferença estatística na concentração de fenólicos.

Alimentos que notavelmente possuem altos teores de fenólicos são café, chá, chocolate, vinhos, frutas, óleos e certos tipos de grãos (WATERHOUSE, 2003). Fumi et al. (2011) incluíram a cerveja nesses alimentos e encontraram resultados que variaram de 84,4 – 515,8 mg de equivalentes de ácido gálico por litro. Baiano e Terracone (2013), Zhao et al. (2010) e Harmanescu et al. (2006) avaliaram a concentração de fenólicos de diversas cervejas utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Baiano e Terracone (2013) encontraram resultados que variaram de 279 mg de equivalentes de ácido gálico por litro, para uma cerveja sem glúten com 3,6% de álcool, até 930 mg de equivalentes de ácido gálico por litro, para uma cerveja do tipo *Export Stout* com 7,98% de álcool. Zhao et al. (2010) avaliaram diversas cervejas do tipo *light american lager*, consumidas em todo o mundo, e encontraram valores que variaram de 150 – 340 mg de equivalentes de ácido gálico por litro. Harmanescu et al. (2006) avaliaram diversos estilos de cerveja e encontraram valores de 524 mg/L, para uma *strong lager* com 7% de álcool, e de 262 mg de ácido gálico por litro para uma cerveja sem álcool. Portanto, comparando os resultados apresentados na Figura 23 com os dados da literatura, percebe-se que os valores encontrados são intermediários, semelhante aos resultados das *premium lagers*, e superiores aos resultados das cervejas *light american lagers*, estilo mais vendido no mundo.

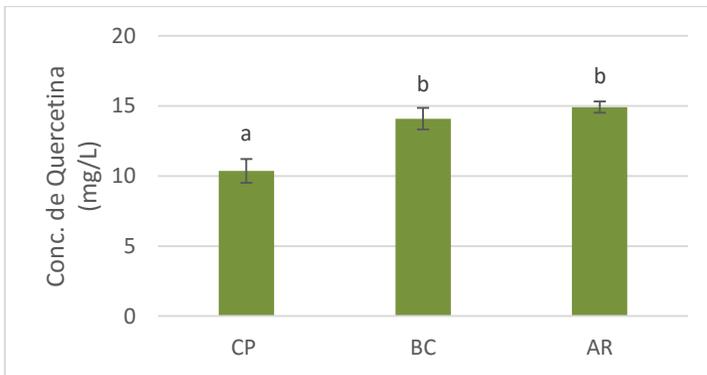
Lee et al. (2003), encontraram valores de fenólicos totais, em mg de equivalentes de ácido gálico, de 330, 600, 160 e 110 em 140 mL de vinho tinto, infusão de 200 mL de cacau, 200 mL de chá verde e 200 mL de chá preto, respectivamente. Schlesier et al. (2002) encontraram concentrações de 492 – 749 e de 199 – 256 mg de equivalentes de ácido gálico por litro para suco de maçã e suco de tomate respectivamente. Sánchez-Moreno et al. (1999) encontraram resultados de 292 mg de equivalentes de ácido gálico por litro para o vinho branco. Comparando os resultados da análise da cerveja com análises de alimentos sabidamente ricos em fenólicos, observa-se que a cerveja de mandioca desenvolvida nesse projeto, tal como outros estilos de cervejas, possui valores comparáveis a esses alimentos.

Os efeitos benéficos das cervejas ao coração podem ser relacionados aos compostos fenólicos, particularmente às suas atividades antioxidantes e biodisponibilidade. WU et al. (2006) recomendam um consumo de 1 g/dia de compostos fenólicos. Portanto, estima-se que o consumo de 330 mL das cervejas BC e AR contribuam com 12% do total diário recomendado de fenólicos.

### 5.3.2.6 Flavonoides totais e equivalência em quercetina

O método colorimétrico aplicado para a medição de flavonoides totais é muito empregado e utilizou-se o composto padrão quercetina, um dos flavonoides mais abundantes em frutas e vegetais (PEREZ-VIZCAINO et al., 2009). Os resultados podem ser observados na Figura 24.

Figura 24 - Concentração equivalente de quercetina das amostras de cerveja padrão, BC e AR, obtida a partir da avaliação de flavonoides totais. Valores são expressos em média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes (n=3). Letras distintas nas colunas representam diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pelo teste Tukey.



Os principais flavonoides da cerveja são isoxantumul, catequina, catequina galato, epicatequina galato, canferol, quercetina, procianidina B3 e prodelfinidina B3 e B9 (CHEN e BLUMBERG, 2009). O consumo de flavonoides impacta em uma cadeia bioquímica, que envolve redução de risco de doença coronária, colesterol, inflamações, estresse oxidativo, entre outros benefícios.

As cervejas experimentais contribuem de forma modesta no consumo diário de flavonoides, segundo os resultados obtidos, mas possui flavonoides que não são encontrados em outras fontes, como o potente prenilflavonoide 8- prenilnaringenina, uma vez que é o único alimento que emprega a flor do lúpulo na sua composição. Os prenilflavonoides do lúpulo possuem ação antioxidante, anticancerígena e anti-inflamatória (GERHAUSER, 2005).

Seis classes de flavonoides da cerveja, incluindo 31 componentes específicos, foram catalogados por Chem e Blumberg (2009), e concentrações variaram de 0,001-20 mg/L para cada um dos flavonoides. Esses resultados foram baseados em dados de De Pascual-Teresa et al. (2000), Gerhäuser (2005), Hertog et al. (1993), entre outros. Essas concentrações variadas são dependentes das condições de plantio das matérias-primas, espécies das matérias-primas, processamento e armazenamento do produto final. Portanto, não há valores concretos na literatura quanto à concentração de flavonoides totais na cerveja, uma vez que essa análise não é amplamente utilizada nesse ramo, mas vale ressaltar que os flavonoides contribuem com aproximadamente 5% dos fenólicos totais da cerveja (SAURA-CALIXTO et al., 2009), o que é condizente com os valores encontrados nas cervejas experimentais desse estudo.

Avaliando os dados das Figuras 22, 23 e 24, dos resultados de atividade antioxidante, fenólicos e flavonoides totais, respectivamente, observa-se que o teor de flavonoides está relacionado ao teor de fenólicos totais, sendo que as cervejas BC e AR apresentaram valores superiores de ambos, em relação à cerveja padrão. Pode-se atribuir essa diferença às farinhas de mandioca aplicadas, o que implica que a farinha de mandioca IAC 576-70 apresenta maior concentração de fenólicos, comparada à farinha de mandioca comum. Por outro lado, a maior concentração de fenólicos das cervejas BC e AR, em comparação à cerveja padrão, não implicou em uma maior atividade antioxidante, uma vez que a cerveja padrão apresentou resultado semelhante às cervejas BC e AR. Uma possível justificativa para esse fato é que a atividade antioxidante da mandioca comercial pode estar relacionada a outros componentes, além dos fenólicos, ou até que os fenólicos presentes nessa mandioca tenham maior capacidade antioxidante. A atividade antioxidante também aumenta com o aumento do teor alcoólico e do amargor das cervejas (MOURA-NUNES et al., 2016), no entanto, as cervejas desse estudo não apresentam diferenças expressivas nesses aspectos.



## 6 CONCLUSÃO

Cervejas experimentais funcionais sem glúten ou com baixo teor de glúten foram elaboradas com sucesso. As matérias-primas foram avaliadas e os resultados foram aplicados para superar os desafios processuais, possibilitando assim, a criação de uma metodologia de produção de cerveja sem glúten a partir de materiais bioativos.

Alcançou-se uma concentração superior de amido resistente na cerveja AR, além de uma maior turbidez, devido à adição de farinha de mandioca durante a fervura.

O  $\beta$ -caroteno não ficou retido no produto final após o processo cervejeiro, mas apesar da extensa degradação dos carotenoides, as cervejas BC e AR apresentaram maior concentração de carotenoides, em relação à cerveja padrão.

As atividades antioxidantes, em equivalentes de ácido gálico, de todas as cervejas mostraram-se próximas e satisfatórias para uma contribuição expressiva no consumo diário. O teor de fenólicos totais foi comparável a alimentos como chá, vinho branco e alguns sucos de fruta. A contribuição de flavonoides, por outro lado, foi modesta.

Os resultados de concentração de glúten apontaram que as cervejas experimentais podem ser consideradas alimentos livres de glúten ou com baixo teor de glúten, portanto, essas bebidas poderão também ser apreciadas pelo público portador da doença celíaca, sempre com cautela e observando os limites máximos seguros para ingestão do glúten, atuando na prevenção de doenças cardíacas, doenças degenerativas e problemas de visão, além de oferecer benefícios à microbiota intestinal e atuar como agente antioxidante.

A partir dos resultados obtidos durante a execução deste projeto, algumas sugestões são dadas para realização em trabalhos futuros: realização de uma análise sensorial das cervejas, que possuem grande potencial para entrada no mercado; estudo do processo de forma a obter maiores concentrações de compostos bioativos no produto final; avaliação da máxima concentração de amido resistente possível de se obter no produto final e qual a relação dessa concentração com a massa de farinha adicionada durante a fervura; estudo de uma matéria-prima brasileira, maltada, funcional e sem glúten para substituir o trigo sarraceno, que possui custo elevado.

Em resumo, pode-se dizer as matérias-primas estudadas ao longo desse projeto apresentam características que as tornam interessantes do ponto vista processual e terapêutico. O projeto desenvolvido colaborou principalmente para ampliar a gama de estudos relacionados à produção

de cervejas utilizando matérias-primas alternativas, contribuindo com dados processuais, como rampa de temperatura e dosagem de enzimas, das matérias-primas e dos produtos finais, especialmente no que tange às análises de bioatividade.

## REFERÊNCIAS

AISSA, A. F.; BIANCHI, M. L. P.; et al. Comparative study of  $\beta$ -carotene and microencapsulated  $\beta$ -carotene: Evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 1418–1424, 2012.

AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; et al. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of functional foods**, v. 5, p. 1542 – 1553, 2013.

ALVAREZ-JUBETE, L.; WIJNGAARD, H.; et al. Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa, buckwheat and wheat as affected by sprouting and baking. **Food Chemistry**, v. 119, p. 770 - 778, 2010.

AMBRÓSIO, C.L.B., CAMPOS, F.A.C.S., FARO, Z.P. Carotenoides como alternativa contra hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, p. 233-243, 2006.

ANNEMÜLLER, G.; MANGER, H. J. **Processing of various adjuncts in beer production**. Alemanha: VLB Berlin, 2013, 163 p.

ANNEMÜLLER, G.; MANGER, H. J.; LIETZ, P. **The yeast in the Brewery**. Alemanha: VLB Berlin, 2011, 440 p.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 18 ed. **Official Methods of the AOAC International**. USA: AOAC, 2005.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 18 ed. **Official Methods of the AOAC International**. USA: AOAC, 2005. [Revisão 3, 2010].

APARICIO-RUIZ, R.; MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. A.; GANDUL-ROJAS, B. Thermal degradation kinetics of lutein,  $\beta$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin in virgin olive oils. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24 p. 811–820, 2011.

ASANTE, P. K. **Suitability of cassava starch as adjunct substitute for barley in the brewing of beer (stout beer)**. 2008. 102 f. Master of Science - Department of Biochemistry, Kwame Nkrumah university of science and technology, Kumasi, 2008.

ASBC (The American Society of Brewing Chemists). **Methods of Analysis**. U.S.A: American Society of Brewing Chemists, 2009.

BACHAR, M.; RAIMANN, J. G.; KOTANKO, P. Impulsive mathematical modeling of ascorbic acid metabolism in healthy subjects. **Journal of Theoretical Biology**, v. 392, p. 35–47, 2016.

BAGHURST, K. I.; et al. Dietary fibre, non-starch polysaccharides and resistant starch – a review. **Food Australia**, v. 48, n. 3, p. 3-35, 1996.

BAIANO, A.; TERRACONE, C. Physico-Chemical Indices, Iso- $\alpha$ -Acid, Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Commercial Beers. **Journal of Food Research**, v. 2, n. 4, p. 107-120, 2013.

BAMFORTH, C.W. Nutritional aspects of beer—a review. **Nutrition Research**, v. 22, p. 227-237, 2002.

BAMFORTH, C. W. **Beer: Health and Nutrition**. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2004. 184 p.

BAMFORTH, C. W. **Brewing: New technologies**. Florida: CRC Press LLC, 2006. 484 p.

BAMFORTH, C.W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 353–357, 2009.

BARBERIS, A.; SPISSU, Y.; FADDA, A.; et al. Simultaneous amperometric detection of ascorbic acid and antioxidant capacity in orange, blueberry and kiwi juice, by a telemetric system coupled with a fullerene- or nanotubes-modified ascorbate subtractive biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 67, p. 214–223, 2015.

BAUER, J.; WALKER, C.; et al. Of pseudocereals and roasted rice, the quest for gluten-free brewing materials. **The Brewer and Distiller**, v. 4, p. 24-26, 2005.

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM (BJCP). BJCP Color Guide. Site do programa que forma jurados de cerveja, cidra e hidromel. Disponível em:

<<http://www.bjcp.org/colorguide.php>>. Acesso em: 15 dez. 2015.

BJCP. Style Guidelines (2008). Guia online do programa internacional de juizes de cerveja dos estilos mais conhecidos. Disponível em: < <http://www.bjcp.org/2008styles/style16.php>>. Acesso em 11 Nov. 2015.

BONE, R. A.; LANDRUM, J. T.; MAYNE, S. T.; et al. Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 42, p. 235–240, 2001.

BOON, C. S.; MCCLEMENTS, D. J.; et al. Factors Influencing the Chemical Stability of Carotenoids in Foods. **Food Science and Nutrition**, v. 50, p. 515–532, 2010.

BOUYSE, F.M.; PAN, W.; GRENETT, H. E.; et al. Mechanism by which alcohol and wine polyphenols affect coronary heart disease risk. **Ann. Epidemiol.**, v. 17, p. S24–S31, 2007.

BOTELHO, S G. **Avaliação da Bioacessibilidade de  $\beta$ -Caroteno em Raízes de Mandioca Amarela (*Manihot esculenta* Crantz) Melhorada In natura e o Efeito do Cozimento e da Fritura.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ/ IQ. Rio de Janeiro, 2011.

BRAUN, L.; COHEN, M. **Herbs and Natural Supplements- An Evidence based Guide.** 2 ed. Australia: Elsevier, 2007.

BURGOS, G.; AMOROS, W.; SALAS, E.; et al. Carotenoid concentrations of native Andean potatoes as affected by cooking. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1131–1137, 2012.

CAI, C.; WEI, C. In situ observation of crystallinity disruption patterns during starch gelatinization. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 469 – 478, 2013.

CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Involvement of Flavanoids in Beer Color Instability during Storage. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 9066–9073, 2007.

CANALES, A. M. **Unmalted grains in brewing**. **Brewing Science**. Londres: Academic Press, p. 233-278, 1979.

CARVALHO, M.; JERÓNIMO, C.; VALENTÃO, P.; et al. Green tea: A promising anticancer agent for renal cell carcinoma. **Food Chemistry**, v. 122, p. 49–54, 2010.

CEBALLOS, H. T.; SÁNCHEZ, N. MORANTE, M.; et al. (2007). Discovery of an Amylose-free Starch mutant in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7469-7476, 2007.

CEBALLOS, H.; LUNA, J. ESCOBAR, A. F.; et al. Spatial distribution of dry matter in yellow fleshed cassava roots and its influence on carotenoid retention upon boiling. **Food Research International**, v. 45, p. 52–59, 2012.

CEREDA, M. P.; VILPOUX, O. F. **Hidrólise do amido: Cultura de tuberosas amiláceas Latino Americanas – Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, v.3, p. 377-448, 2003.

CHAVÉZ, A.L.; SÁNCHEZ, T.; JARAMILLO, G. J.M.; et al. Variation of quality traits in cassava roots evaluated in landraces and improved clones. **Euphytica**, v. 143, p. 125–133, 2005.

CHARLES, A. L.; CHANG, YH.; KO, WC.; et al. Some physical and chemical properties of starch isolates of cassava genotypes. **Starch/Starke**, v. 56, p. 413–418, 2004.

CHARLES, A. L.; ET AL. Functional properties of arrowroot starch in cassava and sweet potato composite starches. **Food Hydrocolloids**, v. 53, p. 187 – 191, 2016.

CHATAKANONDA, P.; CHINACHOTI, P.; SRIROTH, K.; et al. The influence of time and conditions of harvest on the functional behaviour of cassava starch – a proton NMR relaxation study. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p. 233-240, 2003.

CHEN, C.; BLUMBERG, J. Flavonoids in Beer and Their Potential Benefit on the Risk of Cardiovascular Disease. In: Preedy, V.R., Watson,

**R. Encyclopedic Handbook of Beer in Health and Disease Prevention.** Burlington, MA: Academic Press-Elsevier, 2009. p. 831-841.

CHLOPICKA, J.; PASKO, P.; GORINSTEIN, S.; et al. Total phenolic and total flavonoid content, antioxidant activity and sensory evaluation of pseudocereal breads. **LWT – Food Science and Technology**, v. 46, p. 548-555, 2012.

**CODEX ALIMENTARIUS. Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten.** Codex Stan 118 – 1979. Revision: 2008.

COMINO, I.; REAL, A.; MORENO, M. L.; et al. Immunological determination of gliadin 33-mer equivalent peptides in beers as a specific and practical and analytical method to assess safety for celiac patients. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 933-943, 2013.

CONTRERAS, M. P.; HERNANDEZ, C. C.; et al. Fate of free amino nitrogen during liquefaction and yeast fermentation of maize and sorghums differing in endosperm texture. **Food and Bioprocess Processing**, v. 9, p. 46-53, 2013.

CUKALOVIC, L.; DESPOTOVIC, S.; et al. *Ganoderma lucidum* — Medical mushroom as a raw material for beer with enhanced functional properties. **Food Research International**, v. 43 p. 2262–2269, 2010.

DAVEY, M. W.; VAN DEN BERGH, I.; MARKHAM, R.; et al. Genetic variability in *Musa* fruit provitamin A carotenoids, lutein and mineral micronutrient contents. **Food Chemistry**, v. 115, p. 806-813, 2009.

DAVID, M. H.; KIRSOP, B. H. Yeast growth in relation to the dissolved oxygen and sterol content of wort. **Journal of the institute of brewing**, v. 79, p. 20-25, 1973.

DE PASCUAL-TERESA, S.; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J.C. Quantitative analysis of flavan-3-ols in Spanish foodstuffs and beverages. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, p. 5331 – 5337, 2000.

DEECOM & ASSOCIATES LTD. **Beer maturation, chilling and cold storage (for chilled and filtered beer)**. Acervo online de programas de treinamento da empresa Deecom & Associates Ltd em parceria com a Heineken. Disponível em:

<<http://www.daltraining.eu/PDF/08beermaturation/08.1.pdf>>. Acesso em 05 Nov. 2015.

DEFLOOR, I.; DEHING, I.; DELCOUR, J. A. Physico-chemical properties of cassava starch. **Starch/Stärke**, v. 50, n. 2-3, p. 58-64, 1998.

DEPRAETERE, S. A.; DELVAUX, F.; SCHUTTER, D.; et al. The influence of wort aeration and yeast preoxygenation on beer staling processes. **Food Chemistry**, v. 107, p. 242-249, 2008.

DIELI-CRIMI, R.; CÉNIT, M. C.; NÚÑEZ, C. The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. **Journal of Autoimmunity**, v. 64, p. 25-41, 2015.

DIETRYCH-SZOSTAK, D.; OLESZEK, W. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4384-4387, 1999.

DONHOWE, E. G.; FLORES, P. F.; et al. Characterization and in vitro bioavailability of  $\beta$ -carotene: Effects of microencapsulation method and food matrix. **LWT - Food Science and Technology**, v.57, p. 42-48, 2014.

EL-CHAMMAS, K.; DANNER, E. Gluten-free diet in nonceliac disease. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 26, n. 3, p. 294-299, 2011.

ENGLYST, H. N.; ET AL. Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.46, p. 33-50, 1992.

ERIKSSON, J. **Barley starch, structure and properties**. 2012. 27 f. Master's Thesis – Agronomy Program – Food Science, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala, 2012.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization). **Human Vitamin and Mineral**

**Requirements - Report of a joint FAO/WHO expert consultation Bangkok, Thailand.** Food and Nutrition Division, FAO, Rome, 2001.

FARES, C.; PLATANI, C.; BAIANO, A.; et al. Effect of processing and cooking on phenolic acid profile and antioxidant capacity of durum wheat pasta enriched with debranning fractions of wheat. **Food Chem.**, v. 119, p. 1023-1029, 2010.

FERGUSON, L. R.; TASMAN-JONES, C.; ENGLYST, H.; et al. Comparative effects of three resistant starch preparations on transit time and short-chain fatty acid production in rats. **Nutr. Cancer**, v. 36, p. 230-237, 2000.

FERNÁNDEZ-GARCÍA, E.; CARVAJAL-LÉRIDA, I.; JARÉN-GALÁN, M.; et al. Carotenoids bioavailability from foods: From plant pigments to efficient biological activities. **Food Research International**, v. 46, p. 438-450, 2012.

Food Safety Authority of Ireland (FSAI). **Gluten-free foods**, p. 23, 2008.

FRIEDMAN, L. A.; KIMBALL, A. W. Coronary heart disease mortality and alcohol consumption in framingham. **Am. J. Epidemiol.**, v. 124, p. 481-489, 1986.

FUMI, M. D.; GALLI, R.; LAMBRI, M.; et al. Effect of full-scale brewing process on polyphenols in Italian all-malt and maize adjunct lager beers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24 p. 568-573, 2011.

GAESSER, G. A.; ANGADI, S. S. Gluten-Free Diet: Imprudent Dietary Advice for the General Population? **Journal of Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 9, p. 1330-1333, 2012.

GAO, J.; KREFT, I.; CHAO, G.; et al. Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.) starch, a side product in functional food production, as a potential source of retrograded starch. **Food Chemistry**, v. 190, p. 552-558, 2016.

GARCIA, V.; COLONNA, P.; LOURDIN, D.; et al. Thermal transitions of cassava starch at intermediate water content. **Journal of Thermal Analysis**, v. 47, p. 1213 - 1228.

GERHAUSER, C. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agentes. **European Journal of Cancer**, v. 41, p. 1941–1954, 2005.

GIMÉNEZ-BASTIDA, J. A.; PISKULA, M.; ZIELINSKI, H. Recent advances in development of gluten-free buckwheat products. **Trends in Food Science & Technology**, v. XX, p. 1-8, 2015.

GLOBALSPEC. **Turbidity Instruments Information**. Site da empresa IHS Engineering 360, utilizado por engenheiros e profissionais da área da tecnologia como fonte de notícias de mercado, produtos, fornecedores e referências do setor industrial. Disponível em:

<[http://www.globalspec.com/learnmore/sensors\\_transducers\\_detectors/environmental\\_sensors/turbidity\\_instruments](http://www.globalspec.com/learnmore/sensors_transducers_detectors/environmental_sensors/turbidity_instruments)>. Acesso em: 19 de Dez. 2015.

GOÑI, I.; ET AL. Analysis of resistant starch: a method for foods and food products. **Food Chem.**, v.56, p.445-449, 1996.

GRAUMLICH, J. F.; LUDDEN, T. M.; CONRY-CANTILENA, C.; et al. Pharmacokinetic model of ascorbic acid in healthy male volunteers during depletion and repletion. **Pharm. Res.**, v. 14, p. 1133–1139, 1997.

GREEN, P. H. Mortality in celiac disease, intestinal inflammation, and gluten sensitivity. **Journal of the American Medical Association**, v. 302, n. 11, p. 1225-1226, 2009.

GUERRERO, E. L.; NARAYANAN, N. N.; et al. Iron and protein biofortification of cassava: lessons learned. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 257–264, 2012.

HARDWICK, W. A. **Handbook of Brewing**. Estados Unidos: Marcel Dekker, Inc., 1995, 717 p.

HARMANESCU, M.; GERGEN, I.; ISENGARD, H. D. Correlation between total antioxidant capacity and polyphenols content for some beer types. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 12, n. 2, p. 371-376, 2006.

HARZALLAH, A.; BHOURI, A. M.; AMRI, A.; et al. Phytochemical content and antioxidant activity of different fruit parts juices of three figs

(*Ficus carica* L.) varieties grown in Tunisia. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 255–267, 2016.

HART, D. J.; SCOTT, K. J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chem.**, v. 54, p. 101-111, 1995.

HEDREN, E.; DIAZ, V.; et al. Estimation of carotenoid accessibility from carrots determined by an in vitro digestion method. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 56, p. 425–430, 2002.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VAN DE PUTTE, B. Content of Potentially Anticarcinogenic Flavonoids of Tea Infusions, Wines, and Fruit Juices. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, p. 1242-1246, 1993.

HENRY, L. K.; CATIGNANI, G. L.; SCHWARTZ, S. J. Oxidative Degradation Kinetics of Lycopene, Lutein, and 9-cis and All-trans  $\beta$ -Carotene. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, p. 823–829, 1998.

HIGGINS, J. A.; DANA, H. R.; et al. Resistant starch consumption promotes lipid oxidation. **Nutr. Met.**, v 1, p. 1–8, 2004.

HISCHENHUBER, C.; CREVEL, R.; JARRY, B.; et al. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. **Aliment. Pharmacol. Ther.**, v. 23, n. 5, p. 559-75, 2006.

HITACHI HIGH-TECH SCIENCE CORPORATION. **DSC Measurements of Rice**, Application Brief, Tóquio, v. 56, p. 1-2, 1991.

HOENSCH, H. P.; OERTEL, R. The value of flavonoids for the human nutrition: Short review and perspectives. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 3, p. 8-14, 2015.

HOSU, A.; CRISTEA, V-M.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins contente in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113–118, 2014.

HOUGH, J. S. **The Biotechnology of Malting and Brewing**. Inglaterra: Cambridge University Press, 1985, 184 p.

HUGHES, D. A. Dietary carotenoids and human immune function. **Nutrition**, v. 17, p. 823–827, 2001.

IBGE (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA). Produção Agrícola Municipal, 2015. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Levantamento\\_Sistematico\\_da\\_Producao\\_Agricola\\_\[mensal\]/Fasciculo/lspa\\_201509.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201509.pdf)>. Acesso em: 06/11/2015.

IM, J.-S.; HUFF, H. E.; HSIEH, F.-H. Effect of processing conditions on the physical and chemical properties of buckwheat grit cakes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 659– 666, 2003.

JAMBREC, D.; SAKAC, M.; MISAN, A.; et al. Effect of autoclaving and cooking on phenolic compounds in buckwheat-enriched whole wheat tagliatelle. **Journal of Cereal Science**, V. 66, p. 1-9, 2015.

JENKINS, D. J.; et al. Starchy foods and glycemic index. **Diabetes Care**, v.11, n.2, p.149-159, 1988.

JISHA, S.; PADMAJA, G.; et al. Pre-treatment effect on the nutritional and functional properties of selected cassava-based composite flours. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 587–592, 2008.

KALLNER, A. B.; HARTMANN, D.; HORNIG, D. H. On the requirements of ascorbic acid in man: steady-state turnover and body pool in smokers. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 34, p. 1347–1355, 1981.

KALUSEVIC, A.; UZELAC, G.; VELJOVIC, M.; et al. The Antioxidant properties of honey beer. In: **Food Process Engineering a Changing World, Proceedings of the 11th International Congress on Engineering and Food (ICEF11)**, volume III, 2001, Greece, p. 2057-2058.

KISS, Z.; HEGYES, B. V.; et al. Optimization of Technological Processes for Gluten-Free Beer Production. **Acta Alimentaria**, v.40, p. 67-78, 2011.

KLATSKY, A. L. Moderate drinking and reduced risk of heart disease. **Alc. Res. Health**, v. 23, p. 15–23, 1999.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A.; et al. Flavonoid Intake And Coronary Mortality In Finland: A Cohort Study. **British Medical Journal**, v. 312, n. 7029, p. 478–481, 1996.

K'OSAMBO, L.; CAREY, E.; MISRA, A.; et al. Influence of age, farming site, and boiling on pro-vitamin A content in sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) storage roots. **J. Food Compos. Anal.**, v. 11, p. 305–321, 1998.

KOTÍKOVÁ, Z.; SULC, M.; LACHMAN, J.; et al. Carotenoid profile and retention in yellow-, purple- and red-fleshed potatoes after thermal processing. **Food Chemistry**, v. 197, p. 992–1001, 2016.

KUHNEN, S.; LEMOS, P. M. M.; et al. Antiangiogenic properties of carotenoids: A potential role of maize as functional food. **Journal of functional foods**, p. 284 – 290, 2009.

KUNZE, W. Technology: **Brewing & Malting**. 4 ed. Alemanha: VLB Berlin, 2010, 1057 p.

LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, p. 28–40, 2001.

LANDSCHOOT, A. V. Gluten-free barley malt beers. **Cerevisia**, v. 36, p. 93–97, 2011.

LEI, H.; ZHENG, L.; et al. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 76 – 83, 2013.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. Inglaterra: Chapman and Hall, 1995, 260 p.

LI, S. Q.; ZHANG, Q. H. Advances in the development of functional foods from buckwheat. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 41, p. 451-464, 2001.

LI, X.; LI, Z.; et al. Yeast extract promotes phase shift of bio-butanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 using cassava as substrate. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 43 – 51, 2012.

LINDBERG, M. L.; AMSTERDAM, E. A. Alcohol, wine, and cardiovascular health. **Clin. Cardiol.**, v. 31, p. 347–351, 2008.

LIVNY, O.; REIFEN, R.; et al. Beta-carotene bioavailability from differently processed carrot meals in human ileostomy volunteers. **Eur. J. Nutr.**, v. 42, p. 338–345, 2003.

LIU, H.; GUO, X.; LI, W.; et al. Changes in physicochemical properties and in vitro digestibility of common buckwheat starch by heat-moisture treatment and annealing. **Carbohydrate Polymers**, v. 132, p. 237 – 244, 2015.

LUDVIGSSON, J. F.; BAI, J. C.; BIAGI, F. Diagnosis and management of adult coeliac disease: guidelines from the British Society of Gastroenterology. **Gut**, v. 63, n. 8, p. 1210-28, 2014.

MACCAGNAN, G.; PAT, A.; COLLAVO, F.; et al. **Gluten-free beer containing rice malt and buckwheat**. EU (Patente) n. 0949328B1, 2004.

MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MALGORZATA, W.; KONRAD, P. M.; ZIELINSKI, H. Effect of roasting time of buckwheat groats on the formation of Maillard reaction products and antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 196, p. 355–358, 2016.

MAN, J. M.; YANG, Y.; ZHANG, C. Q.; et al. Structural Changes of high-amylose rice starch residues following in vitro and in vivo digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 9332 – 9341, 2012.

MANDANNA, B.; HUGHES, P. S.; BRYCE, J. H. Production of Cassava Beer. In: **Young Scientists Symposium**, Nottingham, 2012.

MARINOVA, G.; BATCHVAROV, V. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. **Bulg. J. Agric. Sci.**, v. 17, p. 11-24, 2010.

MAYER, H.; ET AL. Development of na all rice malt beer: A gluten free alternative. **LWT – Food Science and Technology**, v. 67, p. 67-73, 2016.

MEGAZYME. Resistant Starch Assay Procedure (2011). Site da empresa Megazyme, líder global no desenvolvimento, produção e suprimento de reagentes analíticos, enzimas e kits de ensaio para a indústria de alimentos e bebidas. Disponível em: <[https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-RSTAR\\_DATA.pdf](https://secure.megazyme.com/files/Booklet/K-RSTAR_DATA.pdf)>. Acesso em: 12 de Dez 2014

MENKIR, A.; LIU, W.; ET AL. Carotenoid diversity in tropical-adapted yellow maize inbred lines. **Food Chemistry**, v. 109 p. 521–529, 2008.

MONTAGNAC, J. A.; DAVIS, C. R.; TANUMIHARDJO, S. A. Nutritional Value of Cassava for Use as a Staple Food and Recent Advances for Improvement. **Comprehensive reviews in food Science and food safety**, v. 8, p. 181-194, 2009.

MORESCO, R. **Metaboloma parcial de raízes de genótipos de mandioca de mesa (Manihot esculenta Crantz), com ênfase nas frações amídicas e carotenóidicas, como ferramenta biotecnológica à avaliação da qualidade nutricional e do potencial de uso industrial.** Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

MOSHER, R. **Tasting Beer: An insider’s guide to the world’s greatest drink.** Estados Unidos: Storey Publishing, 2009, 247 p.

MUIR, J.G.; O’DEA, K. Measurement of resistant starch: factors affecting the amount of starch escaping digestion in vitro. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.56, p.123-127, 1992.

MUNTWYLER, J.; HENNEKENS, C. H.; BURING, J. E.; et al. Mortality and light to moderate alcohol consumption after myocardial infarction. **Lancet**, v. 352, p. 1882–1885, 1998.

NIJEBOER, P.; BONTKES, H. J.; MULDER, C. J. J.; et al. Non-celiac gluten sensitivity. Is it in the gluten or the grain? **J. Gastrointest. Liver Dis.**, v. 22(4), p. 435 – 440, 2013.

NOVOZYMES. **Brewing Handbook**, 1a ed., 2013.

NOVOZYMES. Application sheet: Saccharification with Saczyme. Catálogo online da Gusmer Enterprises, distribuidora de enzimas dos Estados Unidos. Disponível em: <[http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/Sac\\_with\\_Saczyme.pdf](http://catalog.gusmerenterprises.com/Asset/Sac_with_Saczyme.pdf)>. Acesso em: 05 Nov. 2015.

O'ROURKE, T. The Function of Wort Boiling. Seção de publicações no The Brewer International do The Institute of Brewing and Distilling (IBD). Disponível em: <<http://www.ibdlearningzone.org.uk/article/show/pdf/493/>>. Acesso em 05 Nov. 2015.

OLIVEIRA, M. A.; MORAES, P. S. B. Características físico-químicas, cozimento e produtividade de mandioca cultivar IAC 576-70 em diferentes épocas de colheita. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. 3, p. 837-843, 2009.

ONYANGO, C.; BLEY, T.; et al. Influence of incubation temperature and time on resistant starch type III formation from autoclaved and acid-hydrolysed cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, p. 494–499, 2006.

PALOZZA, P. Can  $\beta$ -carotene regulate cell growth by a redox mechanism? An answer from cultured cells. **Biochemical et Biophysica Acta**, v. 1740: p. 215– 221, 2005.

PICKERELL, T. W. The influence of free alfa-amino nitrogen in sorghum beer fermentations. **J. Inst. Brew.**, v. 92, p. 568-571, 1986.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; TABERNERO, M.; et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and

beverages: extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, v. 41, p: 274-285, 2008.

PEREZ-VIZCAINO, F.; DUARTE, J.; JIMENEZ, R.; et al. Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin. **Pharmacol Rep.**, v. 61, n. 1, p. 67-75, 2009.

PRAKASH, A. Antioxidant Activity. **Medallion Laboratories Analytical Progress**, 2001.

PHIARAIS, B. P. N; WIJNGAARD, H. H.; et al. The impact of kilning on enzymatic activity of buckwheat malt. **J. Inst. Brew**, v. 111, p. 290-298, 2005.

PHIARAIS, B. P. N.; WIJNGAARD, H. H.; et al. Kilning conditions for the optimization of enzyme levels in buckwheat. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 64, p. 187-194, 2006.

PHIARAIS, B. P. N.; ARENDT, E. K. Malting and brewing with gluten-free cereals. **Gluten-Free Cereal Products and Beverages**, p. 347-372, 2008.

PHIARAIS, B. P. N. et al. Processing of a Top Fermented Beer Brewed from 100% Buckwheat Malt with Sensory and Analytical Characterization. **J. Inst. Brew.**, v. 116, 265–274, 2010.

R-BIOPHARM. RIDASCREEN® Gliadin Competitive (2006). Site da empresa R-Biopharm, líder em desenvolvimento de soluções teste para diagnósticos clínicos e análise de alimentos. Disponível em: <<http://www.r-biopharm.com/products/food-feed-analysis/allergens/gliadin-gluten/item/ridascreen-gliadin-competitive>> Acesso em: 20/12/2015.

RAGAE, S.; SEETHARAMAN, K.; ABDEL-AAL, E. S. M. The impact of milling and Thermal processing on phenolic compounds in cereal grains. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 54, p. 837-849, 2012.

RANDHIR, R.; KWON, Y.-I.; SHETTY, K., Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of selected grain sprouts and seedlings. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 9, p. 355–364, 2008.

RAWEL, HM.; KROLL, J. Die Bedeutung von Cassava (*Manihot esculenta*, Crantz) als Hauptnahrungsmittel in tropischen Ländern. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau**, v. 99, p. 102–110, 2003.

RAWSON, N. E.; HO, CT.; LI, S. Efficacious anti-cancer properties of flavonoids from citrus peels. **Food Science and human wellness**, v. 3, p. 104-109, 2014.

READER, D.; JOHNSON, M. L.; HOLLANDER, P.; et al. Response of resistant starch in a food bar vs. two commercially available bars in persons with type II diabetes mellitus. **Diabetes**, v. 46, p. 254A, 1997.

Redação Sou Agro (2014). Pesquisas com melhoramento de mandioca rendem prêmio a pesquisadora do IAC. O Sou Agro é uma iniciativa multisetorial de empresas e entidades representativas do agro brasileiro. Disponível em:

<<http://souagro.com.br/pesquisas-com-melhoramento-de-mandioca-rendem-premio-a-pesquisadora-do-iac/>> Acesso em: 10/12/2015.

REITENBACH, A. F. **Desenvolvimento de cerveja funcional com adição de probióticos**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC/EQA. Florianópolis, 2010.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B.; KIMURA, M. HarvestPlus **Handbook for Carotenoid Analysis**. HarvestPlus Technical Monograph 2. HarvestPlus, Washington, DC, e Cali, International Food Policy Research Institute (IFPRI) and International Center for Tropical Agriculture (CIAT), 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative analysis, in vitro assessment of bioavailability and antioxidant activity of food carotenoids - A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 726-740, 2010.

ROLLAND-SABATÉ, A.; SANCHEZ, T.; BULÉON, A.; et al. Molecular and supra-molecular structure of waxy starches developed from cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 1451–1462, 2013.

ROSELL, C. M.; BARRO, F.; SOUSA, C.; et al. Cereals for developing gluten-free products and analytical tools for gluten detection. **Journal of cereal science**, v. 59, p. 354-364, 2014.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; et al. Resistant Starch – A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 6, 2006.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, p. 407 – 412, 1999.

SAURA-CALIXTO, F.; SERRANO, J.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J. What Contribution Is Beer to the Intake of Antioxidants in the Diet? In: Preedy, V.R., Watson, R. **Encyclopedic Handbook of Beer in Health and Disease Prevention**. Burlington, MA: Academic Press-Elsevier, 2009. p. 441-448.

SCHERF, K. A.; KOEHLER, P.; WIESER, H. Gluten and wheat sensitivities - An overview. *Journal of Cereal Science*, v. 67, p. 2-11, 2016.

SCHLESIER, K.; HARWAT, M.; BOHM, V.; et al. Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods. **Free Radical Research**, v. 36, p. 177–187, 2002.

SECRETARIA DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO (PARANÁ). Prognóstico da Mandioca, 2014. Disponível em: <[http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca\\_2014\\_15.pdf](http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/mandioca_2014_15.pdf)>. Acesso em: 06/11/2015.

SEMBA, R. D.; DAGNELIE, G. Are lutein and zeaxanthin conditionally essential nutrients for eye health? **Medical Hypotheses**, v. 61, n. 4, p. 465–472, 2003.

SENSOY, I.; ROSEN, R. T.; HO, C. T.; et al. Effect of processing on buckwheat phenolics and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 99, p. 388– 393, 2006.

SILVA, A. P.; JAGER, G.; VAN BOMMEL, R.; ET AL. Functional or emotional? How Dutch and Portuguese conceptualise beer, wine and non-

alcoholic beer consumption. **Food Quality and Preference**, v. 49, p. 54–65, 2016.

SIQUEIRA, E. M. A.; ARRUDA, S. F.; et al.  $\beta$ -Carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 146, parte C, p. 235–240, 2007.

STUPAK, M.; VANDERSCHUREN, H.; et al. Biotechnological approaches to cassava protein improvement. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 634 – 641, 2006.

SUCRANA. Tabela de densidade de soluções açucaradas. A sucra é uma empresa brasileira de engenharia e tecnologia, atuante no mercado de açúcar, etanol e geração de energia a partir de biomassa, cujo site disponibiliza diversas tabelas básicas utilizadas pelas indústrias. Disponível em:

<<http://www.sucrana.com.br/tabelas/densidade-solucoes-acucaradas.pdf>> Acesso em: 15/10/2015.

SWIECA, M. Potentially bioaccessible phenolics, antioxidant activity and nutritional quality of young buckwheat sprouts affected by elicitation and elicitation supported by phenylpropanoid pathway precursor feeding. **Food Chemistry**, v. 192, p. 625–632, 2016.

SYTAR, O. Phenolic acids in the inflorescences of diferente varieties of buckwheat and their antioxidant activity. **Journal of King Saud University – Science**, v. 27, p. 136–142, 2015.

THAKKAR, S. K.; HUO, T.; et al. Impact of Style of Processing on Retention and Bioaccessibility of  $\beta$ -Carotene in Cassava (*Manihot esculenta* Crantz). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1344 – 1348, 2009.

THOMAS, J. Gluten free: The UK Market (2013). Artigo do portal de pesquisa do ramo alimentício, just.food.com, que divulga notícias e realiza análises de mercado global. Disponível em: <[http://www.just-food.com/management-briefing/the-uk-market\\_id123018.aspx](http://www.just-food.com/management-briefing/the-uk-market_id123018.aspx)>. Acesso em: 08/12/2015.

TONUTTI, E.; BIZZARO, N. Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, p. 472 – 476, 2014.

TRUMBO, P. R.; YATES, A. A.; SCHLICKER-RENFRO, S.; et al. Dietary reference intakes: Revised nutritional equivalents for folate, vitamin E and provitamin A carotenoids. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 16, p. 379–382, 2003.

UPDIKE, A. A.; SCHWARTZ, S. J. Thermal Processing of Vegetables Increases Cis Isomers of Lutein and Zeaxanthin. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 6184–6190, 2003.

TUAN, P. A.; THWE, A. A.; KIM, J. K. Molecular characterisation and the light–dark regulation of carotenoid biosynthesis in sprouts of tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum* Gaertn.). **Food Chemistry**, v. 141, p. 3803–3812, 2013.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; et al. The Chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, p. 357-381, 2006.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Hidrolisado de fécula de mandioca como adjunto de malte na fabricação de cerveja: Avaliação química e sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n. 2, Campinas, 1998.

WALTER, L.; SILVA, P. L., et al. Amido resistente: características físico-químicas, propriedades fisiológicas e metodologias de quantificação. **Ciência Rural**, v.35, n.4, p.974-980, 2005.

WATERHOUSE, A. L. Determination of Total Phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, unit II.1, 2003.

WATSON, E. What’s the size of the US gluten-free prize? \$490m, \$ 5bn, or \$10bn? (2014). Análise de mercado do foodnavigator-usa.com, site destinado a divulgar pesquisas, notícias e tendências da indústria alimentícia. Disponível em:

<<http://www.foodnavigator-usa.com/Markets/What-s-the-size-of-the-US-gluten-free-prize-490m-5bn-or-10bn>>. Acesso em: 09/12/2015.

WELSCH, R.; ARANGO, J.; BÄR, B.; et al. Provitamin A accumulation in cassava (*Manihot esculenta*) roots driven by a single nucleotide polymorphism in a phytoene synthase gene. **The Plant Cell**, v. 22, p. 3348–3356, 2010.

WIJNGAARD, H. H.; ARENDT, E. K. Optimization of a mashing program for 100% malted buckwheat. **J. Inst. Brew**, v. 112, p. 57-65, 2006.

WIJNGAARD, H. H.; et al. The effect of germination time on the final malt quality of buckwheat. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v. 64, p. 214-221, 2006.

WITCZAK, M.; ZIOBRO, R.; JUSZCZAK, L.; et al. Starch and starch derivatives in gluten-free systems – A review. **Journal of Cereal Science**, p. 1-12, 2015, DOI: 10.1016/j.jcs.2015.07.007.

WOLTER, A.; HAGER, A-S.; ZANNINI, E.; et al. In vitro starch digestibility and predicted glycemic indexes of buckwheat, oat, quinoa, sorghum, teff and commercial gluten-free bread. **Journal of Cereal Science**, v. 58, p. 431-436, 2013.

WU, X.; BEECHER, G.R.; HOLDEN, J.M.; et al. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. **Journal of agriculture and food chemistry**, v. 54, p. 4069–4075, 2006.

WU, P.; MA, G.; LI, N.; et al. Investigation of in vitro and in vivo antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa* (Ait.) Hassk. **Food Chemistry**, v. 173, p. 194-202, 2015.

YEUM, K. J.; RUSSELL, R. M. Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review of Nutrition**, v. 22, p. 483–504, 2002.

YOSHIZAWA, K.; KISHI, S. Rice in brewing. Rice Chemistry and Technology. **St. Paul: American Society of Cereal Chemists**, p. 619-636, 1985.

ZANDYCKE, S. V. Gluten-reduced beers made with barley. **The New Brewer**, p. 79-84, November/December, 2013.

ZARNKOW, M.; et al. Beer and innovative (functional) drinks based on malted cereals and pseudo-cereals. In: **PROCEEDINGS OF THE 30TH EUROPEAN BREWERY CONVENTION**, Prague, Czech Republic, v. 103, p. 1-8, 2005.

ZHANG, M.; CHEN, H.; LI, J.; et al. Antioxidant properties of tartary buckwheat extracts as affected by different thermal processing methods. **LWT – Food Sci. Technol.**, v. 43, p. 181–185, 2010.

ZETLER, G.; SEIDEL, G.; SIEGERS, C. P.; et al. Relationship between leucocyte and plasma ascorbic acid concentrations. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 10, p. 273–282, 1976.

ZHAO, H.; CHEN, W.; LU, J.; et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v. 119, p. 1150-1158, 2010.

ZHU, F. Composition, structure, physicochemical properties, and modifications of cassava starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 122, p. 456-480, 2015.

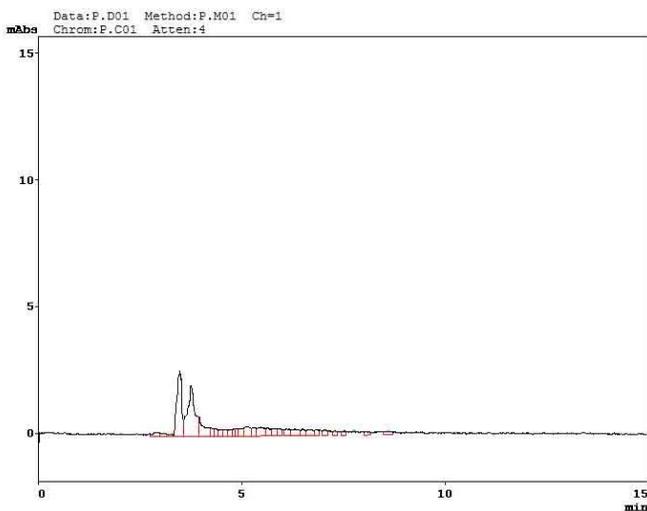
ZIELINSKI, H.; KOZLOWSKA, H.; LEWCZUK, B. Bioactive compounds in cereal grains before and after hydrothermal processing. **Innov. Food Sci. Emerg. Technol.**, v. 2, p. 159-169, 2001.

ZIELINSKI H.; MICHALSKA A.; PISKULA M. K.; et al. Antioxidants in thermally treated buckwheat groats. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 50, p. 824–832, 2006.

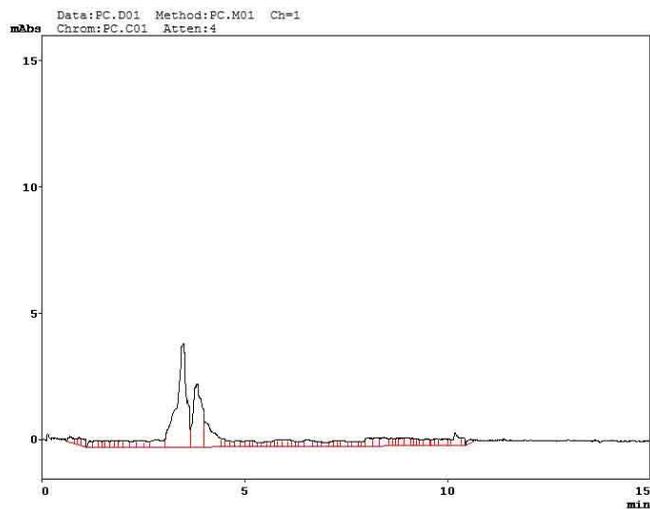
ZIELINSKI, H.; MICHALSKA, A.; AMIGO-BENAVENT, M.; et al. Changes in protein quality and antioxidant properties of buckwheat seeds and groats induced by roasting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 4771–4776, 2009.



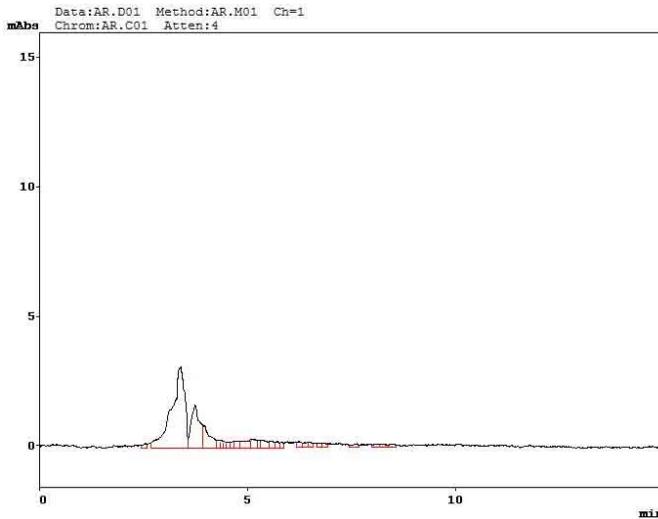
## APÊNDICES



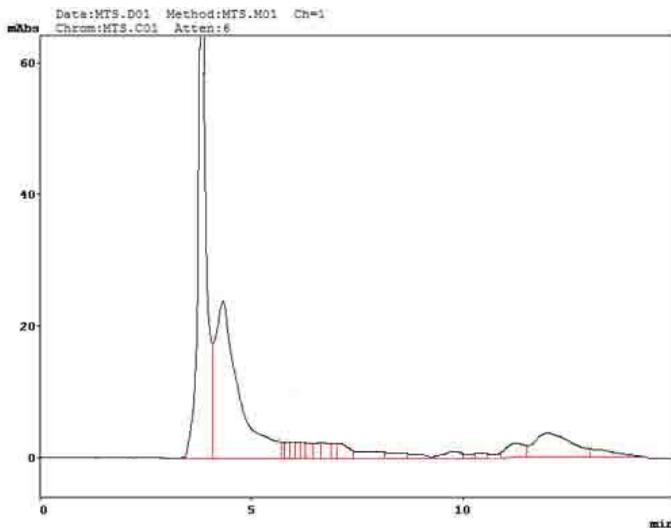
**Figura Suplementar 1** - Perfil cromatográfico (CLAE, 450 nm) de carotenoides da cerveja padrão, mostrando os picos de luteína e zeaxantina, os únicos carotenoides retidos após o processo cervejeiro.



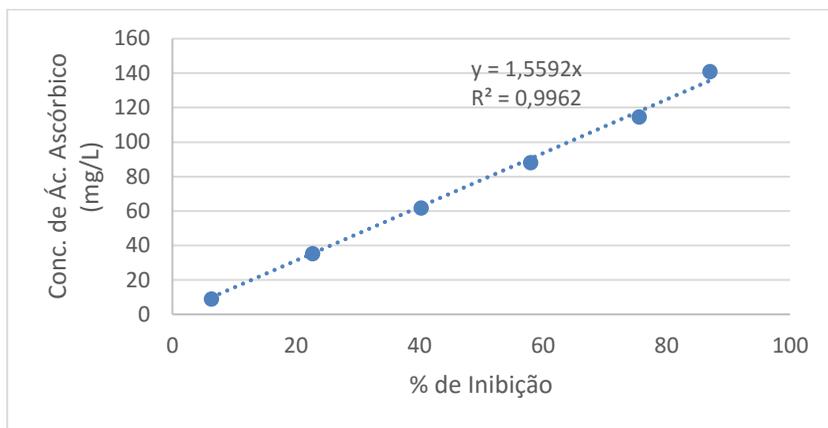
**Figura Suplementar 2** - Perfil cromatográfico (CLAE, 450 nm) de carotenoides da cerveja BC, mostrando os picos de luteína e zeaxantina, os únicos carotenoides retidos após o processo cervejeiro.



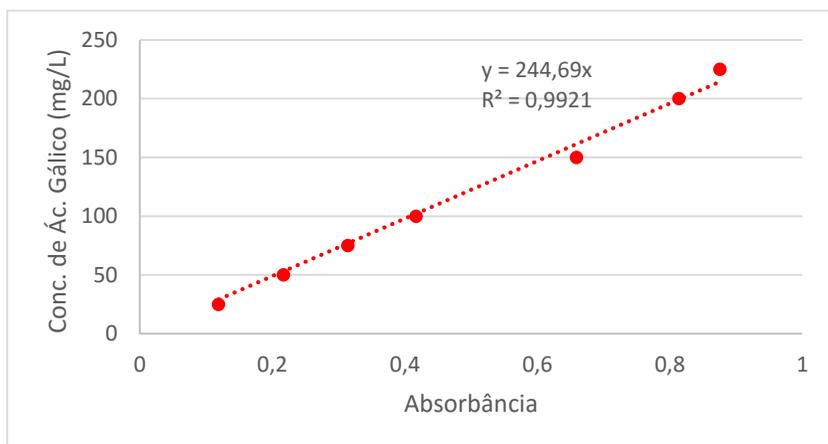
**Figura Suplementar 3** - Perfil cromatográfico (CLAE, 450 nm) de carotenoides da cerveja AR, mostrando os picos de luteína e zeaxantina, os únicos carotenoides retidos após o processo cervejeiro.



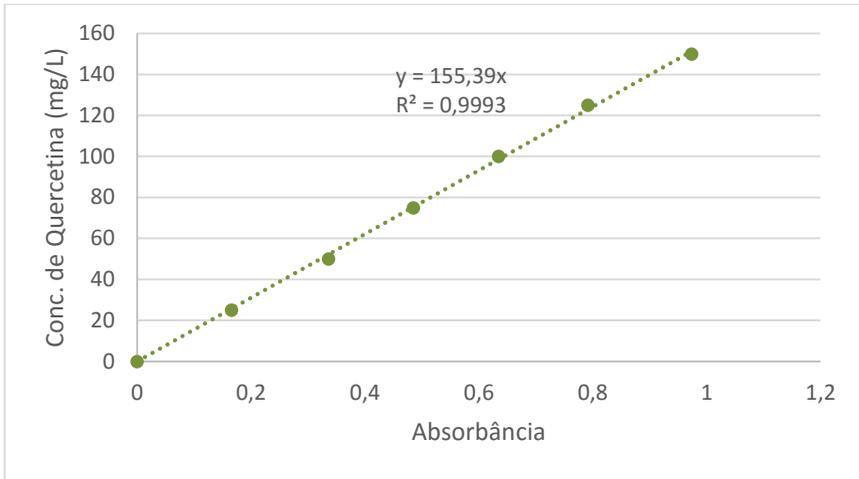
**Figura Suplementar 4** - Perfil cromatográfico (CLAE, 450 nm) de carotenoides do malte de trigo sarraceno, mostrando os picos de luteína e zeaxantina, trans e cis- $\beta$ -caroteno.



**Figura Suplementar 5** – Curva de Calibração de % de Inibição vs. Concentração de Ácido Ascórbico.



**Figura Suplementar 6** – Curva de Calibração de Absorvância (750 nm) vs. Concentração de Ácido Gálico.



**Figura Suplementar 7** - Curva de Calibração de Absorbância (430 nm) vs. Concentração de Quercetina.

## ANEXOS

ANEXO A – LAUDO DE ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE GLUTEN  
DA CERVEJA PADRÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL  
**LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL**  
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itaconibi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001  
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



## CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 11479 / 2015 Data de Entrada: 05/10/2015

Nome do Produto: **CERVEJA EXPERIMENTAL - TAMPA DOURADA**  
 Data de Fabricação: NA Data de Vencimento: NA  
 Marca: NA Nº do Lote: NA  
 Data e Hora da Coleta: NA Nº do Lacre: NA  
 N. Amostras: 1 Nº. Unid. Amostrais: 1 Peso/Volume: 0500 mililitro  
 Amostrado e Coletado por: Cliente Embalagem: garrafa vidro  
 Fabricante: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO  
 Solicitante: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO  
 Responsável: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO  
 Av./Rua: Rua: Gustavo Barroco, 229 CEP: 88070490  
 Complemento: Apto 041 UF: SC  
 Bairro: Capoeiras  
 Cidade: Florianópolis  
 CNPJ/CPF: 072.483.749-38 Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Enviado e coletado por: Natália Joenck Ribeiro - Temp. na coleta: Ambiente.

## RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 15/10/2015 DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 16/10/2015

TECNOLOGIA DE CEREAIS - CERES Analista: Aílcia de Francisco -

Determinação de glúten 5,1ppm(\*)

Metodologia(s):

(\*)ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC, 2005.

----- Continua

Documento Nº. GA-FOR 01 5.19	Revisão 02	Data Emissão 03/08/2015	Página 1
---------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

Continuação Protocolo: 11479 Data de Entrada: 05/10/2015

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S)  
ENSAIO(S)

Amostra analisada esta de acordo com o parâmetro estabelecido para alimento considerado sem glúten. (alimentos com o limite até 20 ppm de glúten são considerados naturalmente sem glúten), Codex Alimentarius Commission: Codex Standart for "Gluten-Free" FAO/WHO - CX/NFSDU 00/4, March, 2000.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 28 de Outubro de 2015

Signatário Autorizado

*Alicia de Francisco*  
Tecnologia de Cereais - LACTE

Documento N° GA-POR 01 5.10	Revisão 02	Data Emissão 03/08/2015	Página 2
--------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

## ANEXO B – LAUDO DE ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE GLUTEN DA CERVEJA BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL  
**LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL**  
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001  
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



### CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 11478 / 2015 Data de Entrada: 05/10/2015

<u>Nome do Produto:</u> CERVEJA EXPERIMENTAL - TAMPÁ VERDE	
<u>Data de Fabricação:</u> NA	<u>Data de Vencimento:</u> NA
<u>Marca:</u> NA	<u>Nº do Lote:</u> NA
<u>Data e Hora da Coleta:</u> NA	<u>Nº do Lacre:</u> NA
<u>N. Amostras:</u> 1	<u>Nº. Unid. Amostrais:</u> 1
<u>Amostrado e Coletado por:</u> Cliente	<u>Peso/Volume:</u> 0500 mililitro
<u>Fabricante:</u> NATÁLIA JOENCK RIBEIRO	<u>Embalagem:</u> garrafa vidro
<u>Solicitante:</u> NATÁLIA JOENCK RIBEIRO	
<u>Responsável:</u> NATÁLIA JOENCK RIBEIRO	
<u>Av./Rua:</u> Rua: Gustavo Barroco, 229	
<u>Complemento:</u> Apto 041	<u>CEP:</u> 88070490
<u>Bairro:</u> Capoeiras	<u>UF:</u> SC
<u>Cidade:</u> Florianópolis	
<u>CNPJ/CPF:</u> 072.483.749-38	<u>Inscrição Estadual:</u>

Observações Gerais: Enviado e coletado por: Natália Joenck Ribeiro - Temp. na coleta: Ambiente.

### RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 15/10/2015 DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 16/10/2015

TECNOLOGIA DE CEREAIS - CERES Analista: Alicia de Francisco -

Determinação de glúten 23ppm(\*)

Metodologia(s):

(\*)ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). Official Methods of the AOAC International, 18th ed. Maryland/USA: AOAC, 2005.

----- Continua

Documento Nº. GA-FOR 01 8.10	Revisão 02	Data Emissão 03/08/2015	Página 1
---------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

Continuação Protocolo: 11478 Data de Entrada: 05/10/2015

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S)  
ENSAIO(S)

Amostra analisada esta de acordo com o parâmetro estabelecido para alimento considerado sem glúten. (alimentos com o limite até 20 ppm de glúten são considerados naturalmente sem glúten), Codex Alimentarius Commission: Codex Standard for "Gluten-Free" FAO/WHO - CX/NFSDU 00/4, March, 2000.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 28 de Outubro de 2015

  
Signatário Autorizado

**Alicia de Francisco**  
Tecnologia de Cereais - LABCAL

Documento N°. GA-FOR 01 5.10	Revisão 02	Data Emissão 03/08/2015	Página 2
---------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

## ANEXO C – LAUDO DE ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE AMIDO RESISTENTE DA CERVEJA PADRÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL  
**LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL**  
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001  
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



### CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 12196 / 2015 Data de Entrada: 27/10/2015

Nome do Produto: **CERVEJA EXPERIMENTAL - TAMPA DOURADA**

Data de Fabricação: NA

Data de Vencimento: NA

Marca: NA

Nº do Lote: NA

Data e Hora da Coleta: NA

Nº do Lacre: NA

N. Amostras: 1 Nº Unid. Amostras: 1

Peso/Volume: 0500 mililitro

Amostrado e Coletado por: Cliente

Embalagem: garrafa vidro

Fabricante: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO

Solicitante: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO

Responsável: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO

Av./Rua: Rua: Gustavo Barroco, 229

Complemento: Apto 041

Bairro: Capoeiras

CEP: 88070490

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CNPJ/CPF: 072.483.749-38

Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Enviado e coletado por: Natália Joenck Ribeiro - Temp. na coleta: Ambiente.

### RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 19/11/2015

DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 19/11/2015

TECNOLOGIA DE CEREAIS - CERES

Analista: Alicia de Francisco -

Amido resistente

0,28g/100g(\*)

Metodologia(s):

(\*)AOAC Internacional. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, 2005. Revision 3, 2010.

----- Continua

Documento N°: GA-FOR 01 5.10	Revisão 02	Data Emissão 03/02/2015	Página 1
---------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

Continuação Protocolo: 12196 Data de Entrada: 27/10/2015

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S)  
ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 19 de Novembro de 2015

*Alicia de Francisco*

Signatário Autorizado

Alicia de Francisco  
Tecnologia de Cereais - LABCAL

## ANEXO D – LAUDO DE ANÁLISE DE CONCENTRAÇÃO DE AMIDO RESISTENTE DA CERVEJA AR



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS - CAL  
**LABORATÓRIO DE ANÁLISES - LABCAL**  
Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, Florianópolis, SC - Brasil - CEP 88034-001  
Fone/fax: (48) 3334-2047 / 3721-5392 / 3721-5391 - E-mail: labcal@contato.ufsc.br



### CERTIFICADO DE ENSAIO

Protocolo: 12195 / 2015 Data de Entrada: 27/10/2015

Nome do Produto: **CERVEJA EXPERIMENTAL - TAMPA PRATEADA**

Data de Fabricação: NA

Data de Vencimento: NA

Marca: NA

Nº do Lote: NA

Data e Hora da Coleta: NA

Nº do Lacre: NA

N. Amostras: 1

Nº. Unid. Amostras: 1

Peso/Volume: 0500 mililitro

Amostrado e Coletado por: Cliente

Embalagem: garrafa vidro

Fabricante: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO

Solicitante: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO

Responsável: NATÁLIA JOENCK RIBEIRO

Av./Rua: Rua: Gustavo Barroco, 229

Complemento: Apto 041

Bairro: Capoeiras

CEP: 88070490

Cidade: Florianópolis

UF: SC

CNPJ/CPF: 072.483.749-38

Inscrição Estadual:

Observações Gerais: Enviado e coletado por: Natália Joenck Ribeiro - Temp. na coleta: Ambiente.

### RESULTADOS DE ENSAIOS

DATA DE INÍCIO DO(S) ENSAIO(S): 19/11/2015

DATA DE TÉRMINO DO(S) ENSAIO(S): 19/11/2015

TECNOLOGIA DE CEREAIS - CERES

Analista: Alicia de Francisco -

Amido resistente

0,74g/100g(\*)

Metodologia(s):

(\*)AOAC Internacional. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th ed. Gaithersburg, 2005. Revision 3, 2010.

----- Continua

Documento Nº: GA-FOR 01 8.10	Revisão 02	Data Emissão 03/08/2015	Página 1
---------------------------------	---------------	----------------------------	-------------

Continuação Protocolo: 12195 Data de Entrada: 27/10/2015

INTERPRETAÇÃO DO(S) RESULTADO(S) DO(S)  
ENSAIO(S)

Amostra analisada apresentou o resultado acima descrito.

Este CERTIFICADO DE ENSAIO(S) refere-se somente ao material submetido ao(s) ensaio(s) e não poderá ser reproduzido parcialmente sem a prévia autorização do LABCAL.

O LABCAL não se responsabiliza pela amostragem, coleta e transporte do material enviado para a realização de ensaio(s), caso não seja mencionado o contrário.

As informações referentes à amostragem e/ou coleta não fazem parte do(s) ensaio(s) e apenas asseguram que as condições de recebimento são adequadas para a execução dos mesmos.

Florianópolis-SC, 19 de Novembro de 2015

Signatário Autorizado  
Aícia de Francisco  
Tecnologia de Cereais - LABCAL