



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos

**OPTIMIZAÇÃO DO REÚSO DE LEVEDURA NA
PRODUÇÃO DE CERVEJA ATRAVÉS DO USO DE
FOLHAS DE *Camellia sinensis***

LEONARDO MARTINS MACHADO

LEONARDO MARTINS MACHADO

**OPTIMIZAÇÃO DO REÚSO DE LEVEDURA NA
PRODUÇÃO DE CERVEJA ATRAVÉS DO USO DE
FOLHAS DE *Camellia sinensis***

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciência de Alimentos

Maringá

2022

Dados Internacionais de Catalogação-
na-Publicação (CIP) (Biblioteca
Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

M149o

Machado, Leonardo Martins

Optimização do reúso de levedura na produção de cerveja através do uso de folhas de *Camellia sinensis* / Leonardo Martins Machado. -- Maringá, PR, 2022.
35 f.tabs.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Roberto Giriboni Monteiro.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Ciências Agrônômicas, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2022.

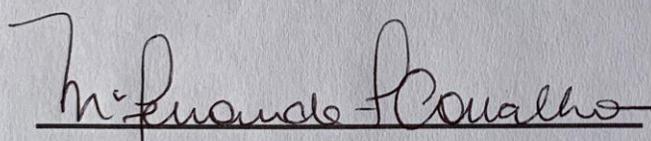
1. Vitalidade . 2. Chá-verde. 3. Reúso. 4. Levedura. 5. Cerveja. I. Monteiro, Antônio Roberto Giriboni , orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Ciências Agrônômicas. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDD 23.ed. 663.42

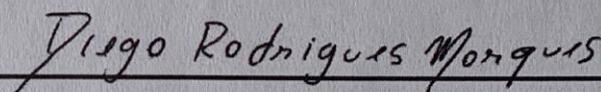
LEONARDO MARTINS MACHADO

**“OPTMIZAÇÃO DO REÚSO DA LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE
CERVEJAS ATRAVÉS DO USO DE FOLHAS DE *CAMELLIA SINENSIS*”.**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Maringá, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Ciência de Alimentos, para obtenção do grau de Mestre em Ciência de Alimentos.



**Profa. Dra. Maria Fernanda Francelin
Carvalho**



Prof. Dr. Diego Rodrigues Marques



**Prof. Dr. Antonio Roberto Giriboni Monteiro
Orientador**

Orientador

Antônio Roberto Giriboni Monteiro

Sumário

OPTIMIZAÇÃO DO REÚSO DE LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE CERVEJA ATRAVÉS DO USO DE FOLHAS DE <i>Camellia sinensis</i>	1
BIOGRAFIA	7
AGRADECIMENTOS.....	9
APRESENTAÇÃO.....	10
GENERAL ABSTRACT	11
RESUMO GERAL.....	14
Resumo.....	17
1. Introdução	17
2. Metodologia	23
2.1 Local.....	23
2.2 Amostra <i>Camellia sinensis</i>	23
2.3 Receita da cerveja	23
2.3.1 Substituição das folhas.....	24
2.4 Vitalidade da levedura.....	24
2.5 Viabilidade da levedura.....	25
2.6 Atividade antioxidante – DPPH	25
2.7 Determinação dos compostos fenólicos totais na cerveja.....	26
2.8 Cor da cerveja.....	26
2.9 Análise estatística.....	26
3. Resultados	26
3.1 Atenuação e Vitalidade	26
3.2 Viabilidade.....	28
3.3 DPPH e Compostos fenólicos presentes (Folin).	28
3.4 pH	30
3.5 EBC.....	31
4. Discussão	32
5. Conclusão	34
6. Referência.....	34

BIOGRAFIA

Leonardo Martins Machado nasceu em 1997 na cidade de Maringá. Possui graduação em Bioquímica pela Universidade Estadual de Maringá. Tem experiência nas áreas de Planejamento e Controle da Produção (PCP) em cervejaria e professor mediador em pós graduação, atuando principalmente nos seguintes temas: educação, alimentos, indústria de bebidas.

Dedico

Família e amigos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que possibilitaram eu chegar até aqui, família, amigos, professores , etc.

Obrigado.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está apresentada na forma de UM artigo científico

- 1 Leonardo Martins Machado, Evandro Ribeiro Machado, Paula Matumoto Pintro, Antônio Roberto Giriboni Monteiro. "OPTIMIZAÇÃO DO REÚSO DA LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE CERVEJAS ATRAVÉS DO USO DE FOLHAS DE *CAMELLIA SINENSIS*." Research, Society And Development.

GENERAL ABSTRACT

INTRODUCTION.

Beer is one of the oldest beverages in the world, being one of the most consumed alcoholic beverages, making it a market with wide possibilities for investment and study (SPÁCIL, TEICHMANNOVÁ, 2016), moving more than 280 billion dollars in the world economy in 2017 (SPÁCIL, TEICHMANNOVÁ, 2016). FORBES, 2018).

This is the result of fermentation from brewer's yeast, malted barley wort or malt extract, previously subjected to a cooking process with the addition of hops or hop extract, in which case a part of the malted barley or malt extract may be partially replaced by brewing adjunct.

The yeast is able to metabolize the fermentable carbohydrates present in the must, having as a product of this metabolization carbon dioxide (CO₂) and alcohol (ethanol), among other by-products such as ethers, polyphenols, etc., this step refers to fermentation.

During fermentation, the yeast is subjected to a state of stress, as the concentrations of alcohols in the tank, among other oxidants and by-products, increase, causing damage to the cell membrane, affecting the permeability of ions and effects on the fluidity of the membrane plasma, which can also generate genetic mutations in yeasts, causing unwanted changes to beer production during fermentation.

The yeast slurry with less vitality will have difficulties in starting the fermentation of the wort to which it is inoculated in a reuse, and in addition to delaying the start of the fermentation of the wort. In this way, it is extremely important to be able to provide the best care and adequate conditions for the yeasts, so that they have good vitality and viability without affecting the quality of the final product,

Studies show that the antioxidant potential of "fermented" teas are lower (DPPH 40.16±0.26 µg/mL) compared to green tea (14.45±0.09 µg/mL) so green tea may be a more viable option to combat free radicals present in a given medium (CAMARGO et al., 2016).

Beverages such as green tea from the *Camellia sinensis* leaf are an example of sources of antioxidants, due to the presence of phenolic compounds in their leaves, such as catechins, which due to their reducing potential are capable of acting as a reducing agent or chelating metal ion. (CAMARGO et al., 2016;)

AIMS.

In this way, due to the presence of antioxidant compounds in the *Camellia sinensis* leaf, the work aims to analyze their effectiveness during the brewing process, adding the ground dried leaves in natura in the boiling process, verifying if the antioxidant activity is capable of protecting and guaranteeing greater vitality for the yeast against the free radicals released by it during its metabolic activity, allowing the reuse of these yeast cultures for 5 more times for brewing beer, without applying treatments to the yeast sludge during reuse.

MATERIAL AND METHODS.

- Sample *Camellia sinensis* - The dehydrated leaves of green tea acquired in Maringá will be used in the form crushed in natura.
- Beer formulation: 2.5 kg pilsen malt, 0.8 kg munich II malt, 0.5 kg wheat malt, 0.3 kg carapils malt, 15 g Hallertau magnum hops (60 min boil), 40 g cascade hops.

The leaves will be added at the final moment of the wort boiling (whirlpoll) so that there is a proper extraction of the antioxidant compounds. The leaves will

be replaced at concentrations of 0%, 20% and 40% referring to Hallertau Magnum, the bittering hops added in the boil.

- Vitality - The vitality of the yeast culture will be evaluated by the acidification power of the medium based on Kaka et al. (1988) with adaptations.
- Feasibility - The methylene citrate blue staining method was used, as described by Smart et al., (1999). In which, live yeasts are not stained with methylene blue, while non-viable yeasts are stained.
- Antioxidant activity - The determination of the scavenging of free radicals present in beers will be performed using the DPPH method (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), according to Rufino et al., (2010).
- Total phenolic compounds in beer - The total phenolic compounds will be determined according to the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method, (Singleton and Rossi, 1965) with modifications (Zhao et al, 2010).
- Beer color - Analysis is performed according to the American Society of Brewing Chemists (ASBC) Methods of Analysis (1958).
- Statistical analysis - Data analysis will be accordingly evaluated by means of analysis of variance (ANOVA), and the means submitted to Tukey's test at 5% probability through the statistical software Statistica.

RESULTS AND DISCUSSION.

- Attenuation and vitality: The reuse with 20% of leaf addition, when comparing the R0 of the same and during the process, there is an increase in the percentage of attenuation of the must, which can be inferred that it is due to a better vitality of the yeast and adaptation the long term of generations. We noticed that the R0, in the 3 concentrations of leaves, obtained different values to the treatments of the fifth reuse (R5), believing that the uses of tea leaves demonstrate the ability to keep the attenuation of the must high during the reuse, thus having a greater wort attenuation, producing a beer with the same quality and profile throughout the process.

- Viability: There was no significant change in the viability of the yeast cells in all treatments, that is, the amount of live yeasts present during the reuses remained independent of the addition of leaves.

It is believed that, as a result of systematic and random errors, such values may have been lower than the expected viability, one hypothesis is the late collection time, which may have proved alcoholic and hydrostatic stress and acidification (pH) in the cells.

- DPPH and Phenolic Compounds present (Folin): We have that the DPPH analysis configures the antioxidant activity present in the tested medium, in this way, the results demonstrate the antioxidant potential of the beers produced. According to the statistical analyses, in the succeeding generations there were significant differences in the quantification of DPPH, we can assume that the variation during the reuse may have had a direct or indirect interference in the vitality of the yeast, it is important to note that the origins of these compounds antioxidants are different from those treated without leaf and with leaf, in this way, when using the data provided by the DPPH analysis tables together with Table 7, in which we have the data obtained from the Folin analysis, we can observe the total of polyphenolic compounds present in beer, we observed a presence of these compounds in different concentrations among the 3 leaf concentrations. We observe in Table 7 that there were no significant statistical variations between the beers produced without tea leaves, remaining constant

during reuse. While we observed the beers produced with 40% addition, as shown in the table, they also did not obtain significant variations in the course of production.

- pH: At the end of fermentation, most beers have a pH of 4.1 to 4.5, with wheat-based beers being a little lower. The final result of the pH obtained in a beer is largely due to the fermentation carried out by the yeast, which releases protons of H⁺ into the medium. Therefore, observing the values obtained, we realized that, with few exceptions, the beers produced remained within the expected pH range. As a comparison, in research by SCHUINA, G. L., et al. (2014) who produced beers with 50 and 100% hop replacement by *Camelia sinensis*, the pH obtained were 4.84 and 3.83, respectively.
- EBC: We found that the additions of leaves interfered with the color of the beer, but that there were variations in the course of production even of the beers without addition of leaves, this may have occurred due to the storage time of the malts, as they were all purchased in one single purchase and same batch, the same applies to the tea leaves to avoid possible harvest variations, and both ingredients were properly stored and sealed, but possibly lost their organoleptic characteristics during storage. According to the Beer Judge Certification Program (BJCP, 2021) summer ales beers have an EBC in the range of 15.7 to 27.6, in this way, we can observe that despite the differences presented, the beers are in the vast majority within the established parameters.

CONCLUSIONS.

In summary, we noticed that the presence of *Camellia sinensis* leaves, obtained for the production of green tea, demonstrated interference in the reused yeasts for the manufacture of summer ale style beers over 5 generations. Demonstrating, as presented, a high attenuation power of the must during the reuse, being able to consider the use of these leaves in an intercalated way during the manufactures in the concentration of 20% of substitution, because it was the one that presented the best results and stability, obtaining then higher values of attenuation and acidification power of the medium, which were revealed between R2 and R3, and in further research, it can be investigated the use of the leaf in an intercalated way and its influence on the vitality of the yeast in more than 10 reuses, for example. Remembering that it is a tea leaf widely used and consumed around the globe, even with a commercial value lower than the kilo of hops, containing several antioxidant components in its composition that interfere with the vitality and quality of the yeast over time. Resuming the possibility of future studies with the leaf to investigate its long-term interference in shelf life. An interesting analysis to be used in future studies to better assess the aspect of yeast vitality is the quantification of glycogen. In addition to seeking other alternative vitality techniques to compare and elucidate the results obtained so far.

Key words: vitality; Green Tea; reuse; yeast; beer

RESUMO GERAL

INTRODUÇÃO.

A cerveja é uma das bebidas mais antigas no mundo, sendo uma das bebidas alcoólicas mais consumidas, tornando um mercado de amplas possibilidades de investimento e estudo (SPÁCIL, TEICHMANNOVÁ, 2016), movimentando mais de 280 bilhões de dólares na economia mundial de 2017 (FORBES, 2018).

Esta é resultante da fermentação a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro.

A levedura é capaz de metabolizar os carboidratos fermentáveis presentes no mosto, tendo como produto desta metabolização dióxido de carbono (CO₂) e álcool (etanol), dentre outros subprodutos como éteres, polifenóis, etcetera, esta etapa refere-se à fermentação.

Durante a fermentação, a levedura é submetida a um estado de estresse, pois aumenta-se as concentrações de álcoois no tanque, dentre outros oxidantes e subprodutos, provocando danificações à membrana celular, afetando a permeabilidade de íons e efeitos na fluidez do plasma da membrana, podendo ainda gerar mutações genéticas nas leveduras, causando modificações indesejadas para a produção de cerveja durante a fermentação.

A lama de levedura com menor vitalidade possuirá dificuldades para iniciar a fermentação do mosto ao qual ela for inoculada em uma reutilização, e além de retardar o início da fermentação do mosto. Desta forma, é de suma importância conseguir proporcionar os melhores cuidados e condições adequadas para as leveduras, para que possuam uma boa vitalidade e viabilidade não afetando na qualidade do produto final,

Estudos comprovam que os potenciais antioxidantes dos chás "fermentados" são menores (DPPH 40.16±0.26 µg/mL), se comparados com o chá verde (14.45±0.09 µg/mL) portanto o chá verde pode ser uma opção mais viável para combater os radicais livres presentes em determinado meio (CAMARGO et al., 2016).

Bebidas como o chá verde proveniente da folha *Camellia sinensis*, é um exemplo de fontes de antioxidantes, decorrente da presença dos compostos fenólicos de suas folhas, como as catequinas, que devido ao seu potencial redutor é capaz de atuar como agente redutor ou íon metálico quelante (CAMARGO et al., 2016;

OBJETIVOS.

Desta forma, decorrente da presença de compostos antioxidantes na folha de *Camellia sinensis*, o trabalho objetiva analisar a eficácia destes durante o processo de fabricação de cerveja, adicionando-se as folhas moídas secas in natura no processo de fervura, averiguando se a atividade antioxidante é capaz de proteger e garantir uma maior vitalidade para a levedura frente aos radicais livres liberados pela mesma durante sua atividade metabólica, possibilitando o reuso destas culturas de leveduras por mais 5 vezes para fabricação de cervejas, sem aplicar tratamentos na lama de levedura durante o reuso.

MATERIAL E METODOS.

• Amostra *Camellia sinensis* - As folhas desidratadas do chá verde adquiridas em Maringá serão utilizadas na forma trituradas in natura.

• Formulação da cerveja: 2.5 Kg de malte pilsen, 0.8 Kg de malte munich II, 0.5 Kg de malte de trigo, 0.3 Kg de malte carapils, 15g de lúpulo Hallerteau magnum (60 min boil), 40g lúpulo cascade.

As folhas serão adicionadas no momento final da fervura do mosto (whirlpoll) para

que haja devida extração dos compostos antioxidantes. As folhas, serão substituídas nas concentrações 0%, 20% e 40% referente Hallertau Magnum, o lúpulo de amargor adicionado na fervura.

- Vitalidade - A vitalidade da cultura de leveduras será avaliada pelo poder de acidificação do meio fundamentado por Kaka et al. (1988) com adaptações.
- Viabilidade - Utilizou-se do método coloração de citrato de metileno azul, conforme descrito por Smart et al., (1999). No qual, as leveduras vivas não são coradas com o azul de metileno, enquanto as não viáveis ficam coradas.
- Atividade antioxidante - A determinação do sequestro de radicais livres presentes nas cervejas será realizada através do método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com Rufino et al., (2010).
- Compostos fenólicos totais na cerveja - Os compostos fenólicos totais serão determinados de acordo com o método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, (Singleton e Rossi, 1965) com modificações (Zhao et al, 2010).
- Cor da cerveja - A análise é realizada de acordo com American Society of Brewing Chemists (ASBC) Methods of Analysis (1958).
- Análise estatística - Análise dos dados de acordo serão avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), e as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade por meio do software estatístico Statistica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO.

▪ Atenuação e vitalidade: O reuso com 20% de adição de folha, ao comparar o R0 da mesma e no decorrer do processo, há um aumento na porcentagem de atenuação do mosto, podendo inferir que seja decorrente a uma melhor vitalidade da levedura e adaptação a longo prazo das gerações. Notamos que o R0, nas 3 concentrações de folhas obteve valores distintos aos tratamentos da quinta reutilização (R5), crendo-se que as utilizações das folhas de chá demonstram capacidade de manter a atenuação do mosto alta no decorrer do reuso, possuindo assim uma maior atenuação do mosto, produzindo uma cerveja com uma mesma qualidade e perfil no decorrer do processo.

▪ Viabilidade: Não houve mudança significativa na viabilidade das células de leveduras em todos os tratamentos, isso é, a quantidade de leveduras vivas presentes no decorrer das reutilizações manteve-se independente da adição de folhas.

Acredita-se que em decorrência de erros sistemáticos e aleatórios possam ter ocasionados tais valores abaixo do esperado de viabilidade, uma hipótese é o tempo de coleta tardio, podendo ter provado estresse alcóólico, hidrostático e acidificação (pH) nas células.

▪ DPPH e Compostos fenólicos presentes (Folin): Temos que a análise de DPPH configura a atividade antioxidante presente no meio testado, desta forma, os resultados demonstram o potencial antioxidante das cervejas produzidas. De acordo com as análises estatísticas, no suceder das gerações houveram diferenças significativas da quantificação de DPPH, podemos pressupor que a variação no decorrer do reuso possa ter tido interferência direta ou indireta na vitalidade da levedura, é importante fazer a ressalva que as origens desses compostos antioxidantes são distintas dos tratamos sem folha e com folha, dessa forma, ao utilizar dos dados fornecidos pelas tabelas de análise de DPPH juntamente com a Tabela 7, na qual temos os dados obtidos da análise de Folin, podemos observar o total de compostos polifenólicos presentes na cerveja, observamos uma presença desses compostos em concentrações distintas entre as 3 concentrações de folha. Observamos na Tabela 7 que não ocorreu variações estatísticas significativa entre as cervejas produzidas sem folha de chá, mantendo-se constante no decorrer do reuso. Enquanto ao observamos as cervejas produzidas com 40% de adição, conforme demonstra a tabela, também não obtiveram variações expressivas no

decorrer das produções.

- **pH:** Ao final da fermentação, a maioria das cervejas apresentam pH de 4,1 a 4,5, sendo as cervejas a base de trigo um pouco menor. O resultado final do pH obtido em uma cerveja é em grande parte decorrente a fermentação realizada pela levedura, a qual libera prótons de H⁺ no meio. Sendo assim, observando os valores obtidos percebemos que, salve raras exceções, as cervejas produzidas mantiveram-se dentro da faixa de pH esperada. A cunho de comparação, em pesquisa de SCHUINA, G. L., et al. (2014) a qual realizaram a produção de cervejas com substituição de lúpulo em 50 e 100% por *Camelia sinensis*, os pH obtidos foram 4,84 e 3,83, respectivamente

- **EBC:** Averiguamos que as adições de folhas interferiram na cor da cerveja, mas que houveram variações no decorrer das produções até mesmo das cervejas sem adição de folhas, isso talvez tenha ocorrido dado ao tempo de armazenamento dos maltes, pois foram adquiridos todos em uma única compra e mesmo lote, o mesmo se aplica para as folhas do chá para evitar possíveis variações de safra, e ambos ingredientes foram devidamente armazenados e vedados, mas possivelmente perderam suas características organolépticas no decorrer do armazenamento. De acordo com Beer Judge Certification Program (BJCP, 2021) as cervejas summer ales possuem um EBC no intervalo de 15,7 a 27,6, desta forma, podemos observar que ainda assim apesar das diferenças apresentadas, as cervejas se encontram em grande maioria dentro dos parâmetros estabelecidos.

CONCLUSÕES: Em síntese, notamos que a presença das folhas de *Camellia sinensis*, obtidas para a produção de chá verde, demonstrou interferência nas leveduras reutilizadas para a fabricação de cervejas do estilo summer ale no decorrer de 5 gerações. Demonstrando, conforme apresentado, um poder de atenuação elevado do mosto no decorrer da reutilização, podendo cogitar o emprego dessas folhas de forma intercalada no decorrer das fabricações na concentração de 20% de substituição, pois foi a qual apresentou melhores resultados e estabilidade, obtendo então maiores valores de poder de atenuação e acidificação do meio, os quais foram revelados entre R2 e R3, podendo ainda em pesquisas posteriores, averiguar o uso da folha de maneira intercalada e sua influência na vitalidade da levedura em mais de 10 reutilizações, por exemplo. Recordando que se trata de uma folha de chá amplamente utilizada e consumida ao redor do globo, inclusive de valor comercial inferior ao quilo do lúpulo, contendo diversos componentes antioxidantes em sua composição que apresentam interferência na vitalidade e qualidade da levedura no decorrer do tempo. Retomando a possibilidade de futuros estudos com a folha para averiguar sua interferência a longo prazo, em shelf life. Uma análise interessante para empregar em estudos futuros, para melhor avaliar o aspecto da vitalidade da levedura é o de quantificação de glicogênio. Além de buscar outras técnicas alternativas de vitalidade para cunho de comparação e elucidação dos resultados obtidos até então.

Palavras chaves: vitalidade; chá-verde; reúso; levedura; cerveja

OPTIMIZAÇÃO DO REÚSO DE LEVEDURA NA PRODUÇÃO DE CERVEJA ATRAVÉS DO USO DE FOLHAS DE *Camellia Sinensis*

Resumo

Cerveja e o chá verde, oriundo as das folhas de *Camellia sinensis*, são duas bebidas amplamente consumidas em todo o mundo, ambas possuindo valor comercial notável no mercado. É habitual que em cervejarias a lama de levedura seja reutilizada para a produção de novas cervejas, muitas vezes sendo reaproveitadas por 4 vezes ou mais. Para produção de uma cerveja de qualidade, deve-se ter leveduras com boa vitalidade, dentre outros aspectos. Para isso, substituímos parcialmente o lúpulo por folhas de chá verde nas concentrações de 20 e 40% durante a etapa de whirlpool, dado que essas folhas possuem alta concentração de antioxidantes, visando otimizar ou manter a vitalidade da levedura durante as reutilizações. Foi avaliado, dentre outras análises, a vitalidade e atividade antioxidante presente no meio no decorrer de 5 gerações de levedura através do poder de acidificação do meio e análise de DPPH, respectivamente, fabricando cervejas estilo summer ale de 0,7L em laboratório. Observou-se que cervejas produzidas com 20% de substituição apresentaram melhores resultados no que diz respeito a vitalidade, atenuação do mosto, pH e cor das cervejas produzidas no decorrer das reutilizações. Em substituição de 40% percebe-se maior interferência indesejáveis em características físico-químicas da cerveja, tais como cor, sabor e pH. Não demonstrando, desta forma, vantagens pela substituição. Torna-se viável, de acordo com os resultados empregar o uso da substituição de 20% de lúpulo por *C. sinensis* de forma intercalada durante os reúsos de levedura para produção de cerveja.

Palavras chaves: vitalidade; chá-verde; reúso; levedura; cerveja

1. Introdução

A cerveja é uma das bebidas mais antigas no mundo, sendo uma das bebidas alcoólicas mais consumidas, tornando um mercado de amplas possibilidades de investimento e estudo (SPÁCIL, TEICHMANNOVÁ, 2016), movimentando mais de 280 bilhões de dólares na economia mundial de 2017 (FORBES, 2018). A cerveja possui notória importância comercial, revelando amplo interesse da população pelo consumo

desta bebida.

Recentemente, os consumidores desta bebida tem sido mais rigorosos quanto a escolha, além de buscarem produtos de alta qualidade, características sensoriais diferentes e com isso novas experiências, dispostos a pagarem mais nestas cervejas especiais (ZANETTA, et al., 2020).

O mercado cervejeiro brasileiro é emergente, sendo atualmente o terceiro maior fabricante da bebida, atrás da China (primeiro lugar) e Estados Unidos (em segundo). No ano de 2019, foram liberados 91 novos registros de estabelecimentos produtores de cerveja, totalizando 610 cervejarias registradas no Brasil (MAPA, 2017). Atualmente o consumo da bebida no Brasil, é de aproximadamente 66,9 L de cerveja per capita, por ano, sendo caracterizada principalmente pelo consumo do tipo Pilsen sabor leve, baixo teor alcoólico (cerca de 4,0% ABV), cor dourada clara e amargor em torno de 10 IBU (international bitterness unit) (MEGA et al., 2016; ZANETTA, et al., 2020).

De acordo com a instrução normativa N° 65 de 10 de dezembro de 2019 do MAPA, tem-se no Art. 2º Conforme definido no art. 36, do Decreto nº 6.871, de 2009, cerveja é a bebida resultante da fermentação, a partir da levedura cervejeira, do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro.

O processo de fabricação possui algumas etapas bases, mostura, fervura, fermentação e maturação e outras subfases. A cevada é o cereal mais comumente utilizado como fonte de amido, após a maltagem as enzimas convertem o amido do malte moído em açúcares fermentáveis durante a mosturação, produzindo então o mosto, o qual é fervido após a etapa de lautering. O malte de cevada juntamente com outros possíveis adjuntos inseridos no mosto serão fonte de nutrientes de compostos nitrogenados, lipídios e vitaminas para obter-se uma boa fermentação, através da ação das leveduras. O lúpulo é adicionado durante a fervura para que transfira amargor ao mosto através dos intermediários de alfa-ácidos, além de possuir atividade antimicrobiana e por fim, para garantir uma boa formação de espuma (FERREIRA et al., 2010).

Importante ressaltar que durante a etapa de mostura existe a rampa de temperatura, a qual é de suma importância para que haja a ativação e a inativação de

certas enzimas em dados momentos. Em temperaturas de 45 a 55° C ocorre a ativação das próteases que degradam proteínas em peptídeos e aminoácidos, sendo esses a principal fonte de nitrogênio que será utilizada pela levedura durante a fermentação. Em seguida, em temperaturas em torno de 55 a 64° C ocorre a gelatinização do amido, tornando-o viável para a ação das amilases. A β – amilase então nessa etapa cliva o amido em maltose. Após, temos a ação da α – amilase a 72° C, ocorrendo a metabolização de polissacarídeos de cadeia longa. Por fim, temos os mash-out que busca inativar as enzimas presente no mosto e diminuir a viscosidade do mesmo (HARRISON, M. A., ALBANESE, J. B. (2017))

Em seguida, após a recirculação do mosto no lautering, temos a fervura, a qual dentre diversos objetivos busca-se eliminar microrganismos que possam conter no mosto, desnaturar enzimas, aumentar a extração de óleos essenciais e resinas presente nos lúpulos, precipitação de substâncias que ocasionam turbidez, além de concentração do mosto a partir da evaporação da água, dentre outros. (HARRISON, M. A. e ALBANESE, J. B. (2017))

Como dito, a levedura é apta para consumir e metabolizar os carboidratos fermentáveis presentes no mosto, tendo como produto desta metabolização dióxido de carbono (CO₂) e álcool (etanol), dentre outros subprodutos como éteres, polifenóis, etcetera, esta etapa refere-se à fermentação. Leveduras não somente produzem dióxido de carbono e etanol, mas também ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos e outros, como álcoois de massa molar elevada (PINHO, FERREIRA, SANTOS, 2006; FERREIRA et al., 2010).

Durante a fermentação, a levedura é submetida a um estado de estresse, pois aumenta-se as concentrações de álcoois no tanque, provocando danificações à membrana celular, afetando a permeabilidade de íons e efeitos na fluidez do plasma da membrana, podendo ainda gerar mutações genéticas nas leveduras, causando modificações indesejadas para a produção de cerveja durante a fermentação. Uma cultura de levedura é classificada como de “alta vitalidade”, quando esta é capaz de realizar uma boa fermentação, ou seja, de uma certa forma representa o estado fisiológico atual da população de leveduras. São células saudáveis e fortes, podendo medir-se a vitalidade através da atividade metabólica da levedura (ARCHANA et al., 2015; WHITE, ZAINASHEFF. 2010.)

Além do estresse submetido à levedura devido ao meio inserido, há também o

estresse oxidativo que ocorre normalmente nos organismos, no entanto, em determinadas condições os níveis de radicais livres (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, ROS e RNS) ultrapassam os limites não prejudiciais, causando danos a macromoléculas do organismo, como proteínas, carboidratos, peroxidação lipídica, etc., afetando diretamente na viabilidade e vitalidade das células de levedura. Por mais que as células possuam mecanismos para eliminar esses radicais livres, o envelhecimento e outros fatores fisiológicos tornam esses mecanismos menos eficientes. (SUBHASWARAJ, et al., 2017; KOREN, et al., 2019).

Decorrente aos oxidantes presentes e que são formados durante todo o processo de produção da cerveja, mais o estresse decorrente ao aumento da concentração de etanol durante a fermentação, isto ocasiona, conforme já dito, inúmeros problemas e situações que comprometem a qualidade da levedura. Isso leva a alguns problemas direto na qualidade da cerveja a ser produzida, por exemplo, podendo ocasionar “sluggish” fermentations, que seria uma fermentação lenta, ou até mesmo a uma fermentação incompleta, “stuck fermentations”, além de poder ocasionar “off-flavours” na cerveja, dado aos danos ocasionados por estes oxidantes na levedura. Os quais comprometem diretamente em inúmeras funções celulares, como taxa metabólica, crescimento e viabilidade celular. (BLEOANCA, I. et. al (2013); WALKER, G. M., BASSO, T. O. (2019))

Temos por viabilidade a habilidade das células em crescer, reproduzir-se e interagir com o ambiente ao qual está inserida. Enquanto vitalidade designa as características e capacidades das células de microrganismos frente a sua atividade metabólica e resistência ao estresse. (MAGALHÃES, P. J. et. al 2016)

A perda ou a diminuição da vitalidade da levedura é intensificada decorrente a presença de uma alta quantidade de radicais livres, pois como dito, estes afetam a estrutura da célula em diversos níveis e organelas. Desta forma, uma cultura de células com menor vitalidade inviabiliza o reuso da lama de levedura por mais vezes, pratica a qual é comum nas cervejarias. Esta lama com menor vitalidade possuirá dificuldades para iniciar a fermentação do mosto ao qual ela for inoculada, e além de retardar o início da fermentação do mosto, poderá afetar também nas características palatáveis da cerveja decorrente a produção de uma maior quantidade de subprodutos indesejáveis, como aldeídos e compostos cetônicos. Desta forma, é de suma importância conseguir proporcionar os melhores cuidados e condições adequadas para as leveduras, para

que possuam uma boa vitalidade e viabilidade não afetando na qualidade do produto final, a cerveja, além de possibilitar uma economia para a fábrica decorrente a reutilização da levedura, dado que o porcentual de custo de levedura em uma produção de cerveja de 300 L é em torno de 14 a 25% do custo total. (GIBSON et al., 2007)

O reuso das leveduras, normalmente coletadas do fundo dos tanques de fundo cônico em cervejarias para a fabricação de novas cervejas, é uma atividade comum, pois resulta em uma significativa redução dos custos, dado que um pacote de um quilo de lúpulo em pellet custa em média de 220 reais a 400, dependendo da espécie. Enquanto um quilo de *camellia sinensis* custa de 40 a 50 reais. Além da economia apresentada pelo reuso das leveduras, sem ter que utilizá-las cepas novas em cada fermentação de mosto. Sendo estocadas em freezers ou reutilizadas instantaneamente no dia da coleta. No entanto, a quantidade de vezes que a levedura pode ser reaproveitada é limitada, pois sua reutilização afeta a qualidade da levedura, diminuindo sua vitalidade e viabilidade. O reuso de novas gerações de leveduras a partir da geração pura (ou seja, a geração de leveduras novas, recém compradas), pode causar danificações às células, afetar na qualidade da replicação, oxidações em suas macromoléculas, etc., afetando consequentemente na qualidade da cerveja a ser produzida. (POWELL, C. 2003)

Em complemento, outra bebida também amplamente consumida, em especial nos países do oriente, é o chá. Este possui inúmeras variações e proveniências, porém, o mais consumido provém da folha *Camellia sinensis*, obtendo-se através da fervura de suas folhas, o chá verde. A composição deste chá é rica em compostos fenólicos com atividade antioxidante, em especial a presença do grupo das catequinas, representando cerca de 6 a 16% das folhas secas. (CAMARGO et al., 2016; KARORI et al., 2007).

O caso do chá verde é classificado como não fermentado, ocorrendo somente à fervura das folhas para sua obtenção. A “fermentação” do chá refere-se a reações naturais de escurecimento enzimático, obtendo-se o chá preto (NISHIYAMA et al., 2010). Estudos comprovam que os potenciais antioxidantes dos chás “fermentados” são menores (DPPH 40.16 ± 0.26 $\mu\text{g/mL}$), se comparados com o chá verde (14.45 ± 0.09 $\mu\text{g/mL}$) portanto o chá verde pode ser uma opção mais viável para combater os radicais livres presentes em determinado meio (CAMARGO et al., 2016), inclusive economicamente, dado que o quilo do chá preto custa aproximadamente 30% mais caro que o chá verde. Além da presença de outros compostos como flavonoides,

flavonas, ácidos fenólicos, sólidos solúveis, potássio, ferro e cafeína, dentre outros (RETO et al., 2007; NISHIYAMA et al., 2010)

Antioxidantes são compostos com propriedades capazes de atenuar o estresse oxidativo, através de inibição de enzimas pró-oxidativas, sequestro de radicais livres, íons metálicos quelantes, etc. Bebidas como o chá verde proveniente da folha *Camellia sinensis*, é um exemplo de fontes de antioxidantes, decorrente da presença dos compostos fenólicos de suas folhas, como as catequinas, que devido ao seu potencial redutor é capaz de atuar como agente redutor ou íon metálico quelante (CAMARGO et al., 2016; KOREN et al., 2019).

Segundo Guglielmotti M. et al (2020), os principais fatores que influenciam no tempo de prateleira de uma cerveja estão relacionados com a oxidação e turbidez. No que diz respeito da oxidação, tem-se um processo que ocorre principalmente a formação de compostos voláteis e off flavors. Por outro lado, através dos polifenóis, se é capaz de diminuir a oxidação do meio decorrente ao seu mecanismo de inativação dos radicais livres presente no meio, através de seu grupo hidroxifenólico, estabilizando o elétron não acoplado em seu anel aromático.

Desta forma, decorrente da presença de compostos antioxidantes na folha de *Camellia sinensis*, o trabalho objetivou analisar a eficácia destes durante o processo de fabricação de cerveja, adicionando-se as folhas moídas secas in natura no processo de fervura, averiguando se a atividade antioxidante é capaz de proteger e garantir uma maior vitalidade para a levedura frente aos radicais livres liberados pela mesma durante sua atividade metabólica, possibilitando o reuso destas culturas de leveduras por mais 5 vezes para fabricação de cervejas, sem aplicar tratamentos na lama de levedura durante o reuso.

Objetivo

O presente trabalho buscou avaliar e analisar a capacidade da *Camellia sinensis* em melhorar a vitalidade das leveduras na produção de cerveja do estilo Summer Ale buscando aumentar o reuso da lama de levedura para produção de novas cervejas.

Objetivou-se obter tal feito através da adição de *Camellia sinensis* em cervejas artesanais estilo american amber ale, também chamada de summer ale, nas concentrações 0%, 20% e controle 40% de substituição referente ao lúpulo de amargor adicionado na fervura (Hallertau Magnum). Intencionou-se averiguar e elucidar o efeito

dessa adição com o viés de que as leveduras obtenham uma melhor vitalidade, quantificando o potencial antioxidante presente na cerveja, verificando sua vitalidade através do poder de acidificação do meio e viabilidade pela coloração de citrato de metileno azul.

2. Metodologia

2.1 Local

As cervejas serão produzidas na cidade de Maringá/PR, na Universidade Estadual de Maringá, bloco 115. Os experimentos e análises serão realizadas nas dependências da universidade, nos blocos: 115, 13 e O27

2.2 Amostra *Camellia sinensis*

As folhas desidratadas do chá verde serão adquiridas no comércio local (Maringá - PR) e serão utilizadas na forma trituradas para inclusão na cerveja. As folhas serão acondicionadas hermeticamente ao abrigo do sol e da umidade.

2.3 Receita da cerveja

O estilo de cerveja a ser fabricado será, havendo como composição padrão para todas as amostras de cerveja, conforme na tabela a seguir:

Tabela 1 - Formulação cerveja - Summer Ale

Ingrediente	Quantidade
Malte – Pilsen	200 g
Malte – Munich II	80 g
Malte de Trigo	50 g
Malte – Carapils	30 g
Lúpulo – Hallertau Magnum (Boil 60 min)	1.5 g
Lúpulo – Cascade (Whirlpool 30 min)	1.0 g
Lúpulo – Ella (Whirlpool 30 min)	2.0 g

As cerveja com volume de mosto 2 L foi dividida em três partes iguais para a fervura, podendo assim realizar os três tratamentos de concentrações de folhas. A adição das

folhas de *C. Sinensis* foi adicionada no whirlpool, após 1h de fervura. Após a etapa de whirlpool, separou-se cada tratamento em 9 fermentadores adaptados de 200 mL para que ocorresse a fermentação em triplicata de cada variável de concentração. Adicionou-se 0.15 g de levedura US-05 em cada fermentador previamente esterelizado com ácido peracético.

2.3.1 Substituição das folhas

As folhas serão adicionadas no momento final da fervura do mosto (whirlpoll) para que haja devida extração dos compostos antioxidantes. As folhas, como já dito, serão substituídas nas concentrações abaixo referente ao ingrediente: Hallertau Magnum, o lúpulo de amargor adicionado na fervura.

Tabela 2 - Concentrações das substituições pela folha *C. sinensis*

Amostra de cerveja	Concentração de folha
Controle (C)	0%
Baixa concentração (BC)	20%
Alta concentração (AC)	40%

Serão realizadas 6 gerações de cerveja, em cada geração haverá 3 variações conforme demonstrado na tabela acima. Essas 3 variações (controle, baixa e alta concentração) serão produzidas em triplicata em volume de 0,7 L cada, utilizando-se a lama da levedura residual do processo antecedente para a fabricação da nova cerveja.

No que diz respeito a rampa de temperaturas para a fabricação da cerveja, será empregado conforme a tabela abaixo:

Tabela 3 - Descrição: rampa de temperatura.

Descrição	Temperatura	Tempo
Adicionar 2L de água e aquecer para 50° C durante 10 minutos	50° C	5 min
Aquecer para 63° C durante 10 minutos	63° C	30 min
Aquecer para 72° C durante 10 minutos	72° C	20 min
Aquecer para 77° C durante 5 minutos	77° C	10 min

2.4 Vitalidade da levedura

A vitalidade da cultura de leveduras será avaliada pelo poder de acidificação do meio fundamentado por Kaka et al (1988) com adaptações. Para tal, uma alíquota de 3

mL das amostras da lama de levedura foi centrifugada a 9.000 rpm 3 minutos, a 25°C. O precipitado celular foi lavado três vezes com água destilada estéril e então, misturado com 5 mL de água destilada estéril (pH 6), em temperatura ambiente, mantendo sob agitação magnética. O pH inicial da suspensão celular foi registrado e novamente um novo registro após 10 minutos e então, adicionou-se 500µL de uma solução de 50% (p/v) de glicose estéril e novamente o pH é registrado após 10 minutos de agitação. O poder de acidificação (PA), que indica a vitalidade da levedura foi calculado através da equação a seguir:

$$PA = (pH_0 - pH_{10}) + (pH_{10} - pH_{20})$$

Sendo, pH₀ é o valor do pH inicial (tempo 0 minutos), pH₁₀ se dá ao valor do pH em 10 min após o início do experimento e, por fim, pH₂₀ o valor registrado após 10 minutos da adição de glicose no experimento.

2.5 Viabilidade da levedura

No que diz respeito as células viáveis, utilizou-se do método coloração de citrato de metileno azul, conforme descrito por Smart et al., (1999). No qual, as leveduras vivas não são coradas com o azul de metileno, enquanto as não viáveis ficam coradas.

Para realização do experimento, uma solução aquosa de 0,1% (p/v) de azul de metileno foi utilizada para a coloração. As células de levedura foram diluídas em tampão de glicina 0,1 M em proporção 1:100 e então 1 mL da diluição é incubada com 1 mL de azul de metileno por 15 minutos. Uma alíquota de 10µL desta suspensão é aplicada em câmara de Neubauer para contagem de número de células coradas (inviáveis) e células não coradas (viáveis).

A viabilidade da amostra é determinada, de acordo com a equação a seguir:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\sum tc - \sum cm}{\sum tc} \times 100$$

Sendo, $\sum tc$ o somatório de total de células obtidos câmara de Neubauer e $\sum cm$, o somatório de células não viáveis (coradas com azul de metileno) obtido em câmara de Neubauer.

2.6 Atividade antioxidante – DPPH

A determinação do sequestro de radicais livres presentes nas cervejas será realizada

através do método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), de acordo com Rufino et al., (2010).

2.7 Determinação dos compostos fenólicos totais na cerveja.

Os compostos fenólicos totais serão determinados de acordo com o método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu, (Singleton e Rossi, 1965) com modificações (Zhao et al, 2010). O método consiste em utilizar 0,5 ml de cerveja diluída com a adição de 2,5 ml de Folin-Ciocateu diluído 10 vezes, aguardando 5 minutos de reação, em seguida adicionar 2 mL de Na₂CO₃ 7,5% e suplementar com água deionizada até atingir 10 ml. Após 30 minutos de repouso à temperatura ambiente, a leitura é realizada a 760 nm. A medição será então comparada a uma curva padrão de ácido gálico (GAE) e o resultado será expresso em mg de GAE por litro de cerveja (mg GAE.L⁻¹).

2.8 Cor da cerveja

A análise é realizada de acordo com American Society of Brewing Chemists (ASBC) Methods of Analysis (1958). Os valores serão dados em unidades de EBC (European Brewery Convention) sendo mensurado através de espectrofotômetro à 430 nm de comprimento de onda.

2.9 Análise estatística

Análise dos dados de acordo serão avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA), e as médias submetidas ao teste de Tukey a 5% de probabilidade por meio do software estatístico Statistica.

3. Resultados

3.1 Atenuação e Vitalidade

Tabela 4 – Porcentagem de atenuação

Reuso	R0	R1	R2	R3	R4	R5
AT. 0%	44,06±3,77 ^{Bbc}	44,44±0,84 ^b	48,33±1,33 ^{ab}	51,82±0,74 ^{ab}	43,54±0,90 ^b	56,21±0,75 ^{Aa}
AT.20%	45,80±1,61 ^{Bbc}	44,87±1,40 ^b	46,13±0,67 ^b	49,28±0,77 ^{ab}	47,08±1,24 ^{ab}	52,10±0,32 ^{ABa}
AT.40%	39,76±0,31 ^{Ce}	45,40±0,32 ^d	51,72±0,32 ^{abc}	53,54±0,01 ^{ab}	47,42±2,38 ^{cd}	54,31±0,50 ^{Aa}

As médias seguidas pelas diferentes letras minúsculas nas linha e maiúsculas nas colunas diferem estatisticamente significativamente umas das outras pelo teste de comparação múltipla de Tukey em P < 0,05.

Tabela 5 - Vitalidade das leveduras

Reuso	R0	R1	R2	R3	R4	R5
MÉD.0%	0,7±0,06 ^a	0,65±0,06 ^{ab}	0,46±0,06 ^{ab}	0,41±0,06 ^b	0,52±0,06 ^{ab}	0,10±0,01 ^c
MÉD.20%	0,6 ±0,06 ^{ab}	0,86±0,06 ^a	0,23±0,06 ^c	0,19±0,06 ^c	0,40±0,06 ^{bc}	0,14±0,06 ^c
MÉD.40%	0,6±0,06 ^a	0,18±0,06 ^{bc}	0,14±0,06 ^{bc}	0,41±0,06 ^{ab}	0,39±0,06 ^{abc}	0,12±0,06 ^c

As médias seguidas pelas diferentes letras minúsculas nas linha e maiúsculas nas colunas diferem estatisticamente significativamente umas das outras pelo teste de comparação múltipla de Tukey em $P < 0,05$.

Determinamos a gravidade específica da cerveja fermentada, avaliando grau de metabolização dos açúcares fermentescíveis presentes. Sabemos que levedura com uma boa vitalidade e ambiente minimamente propício ao seu desenvolvimento irá metabolizar maior quantidade desses carboidratos, atenuando assim a gravidade do mosto e consecutivamente, produzindo etanol, dióxido de carbono e outros subprodutos. Notamos, através da Tabela 4, uma certa constância estatisticamente nas produções sem a adição de folha no decorrer do reuso da levedura. Enquanto no reuso com 20% de adição de folha, ao comparar o R0 da mesma e no decorrer do processo, há um aumento na porcentagem de atenuação do mosto, podendo inferir que seja decorrente a uma melhor vitalidade da levedura e adaptação a longo prazo das gerações. Enquanto ao tratamento com 40% de adição de folhas de *Camellia sinensis* observa-se um aumento da taxa de atenuação a partir do segundo reuso, mantendo-se até o quinto reaproveitamento.

Ao compararmos os valores estatísticos em maiúsculo da mesma tabela, notamos que o R0, nas 3 concentrações de folhas obteve valores distintos aos tratamentos da quinta reutilização (R5), crendo-se que as utilizações das folhas de chá demonstram capacidade de manter a atenuação do mosto alta no decorrer do reuso, possuindo assim uma maior atenuação do mosto, produzindo uma cerveja com uma mesma qualidade e perfil no decorrer do processo.

A decorrência dessa possível manutenção da vitalidade no decorrer da reutilização da levedura pode estar correlacionada com a alta concentração de compostos antioxidantes presentes nas folhas de *C. sinensis*, tais como catequinas, flavonoides e cafeína, o que torna algo interessante para o processo e a aplicação em cervejarias de pequeno e médio porte, garantindo um reuso da lama por mais tempo ou se ainda reutilizado na mesma quantidade de vezes, seria interessante, pois manteria o perfil e “saúde” da levedura, não ocasionando alterações bruscas e perceptíveis na

qualidade da cerveja, podendo ainda evitar exacerbada geração de off-flavors, uma vez que alguns compostos são gerados após a perda ou diminuição da vitalidade da levedura (NISHIYAMA, M. F. et al., (2010); WAUTERS, R. (2021)).

3.2 Viabilidade

Tabela 6 - Porcentagem de Viabilidade

Reuso	R0	R1	R2	R3	R4	R5
MÉDIA 0%	55,11±10,03 ^a	58,99±2,52 ^a	60,67±1,97 ^a	64,12±2,82 ^a	70,16±2,19 ^a	65,30±2,33 ^a
MÉDIA 20%	57,91±0,49 ^a	63,77±4,13 ^a	66,21±3,27 ^a	62,42±3,72 ^a	67,72±1,07 ^a	65,95±1,33 ^a
MÉDIA 40%	53,89±14,56 ^a	60,89±3,36 ^a	63,70±5,78 ^a	66,40±3,42 ^a	63,95±1,46 ^a	60,67±5,30 ^a

As médias seguidas pelas diferentes letras minúsculas nas linha e maiúsculas nas colunas diferem estatisticamente significativamente umas das outras pelo teste de comparação múltipla de Tukey em $P < 0,05$.

Depreendemos da Tabela 6 que não houve mudança significativa na viabilidade das células de leveduras em todos os tratamentos, isso é, a quantidade de leveduras vivas presentes no decorrer das reutilizações manteve-se independente da adição de folhas. Dessa forma, a presença das folhas não interferiu nas células, não sendo um inibidor ao seu crescimento e também não sendo um fator de crescimento, o que potencializa a viabilidade do emprego desta folha, possibilitando uma vitalidade acentuada.

Algo similar ocorreu nos estudos de Kordialik-Bogacka E., Diowksz A. (2013), no qual a viabilidade de suas células não apresentou diferença estatística no decorrer de dez gerações, porém apresentando viabilidade superior a 98%, valor superior aos níveis de viabilidade apresentados aqui. No entanto, o referido trabalho empregou fermentação de mosto de 10 °P a 15 °P à 9 °C, todavia, os valores da viabilidade aqui apresentados são considerados valores abaixo do ideal para a reutilização ($\geq 95\%$ de células viáveis). Acredita-se que em decorrência de erros sistemáticos e aleatórios possam ter ocasionados tais valores abaixo do esperado de viabilidade, uma hipótese é o tempo de coleta tardio, podendo ter provado estresse alcóolico, hidrostático e acidificação (pH) nas células.

3.3 DPPH e Compostos fenólicos presentes (Folin).

Tabela 7 - DPPH

Reuso	R0 (%)	R1 (%)	R2 (%)	R3 (%)	R4 (%)	R5 (%)
MÉDIA 0%	79,58±1,31 ^{Aa}	79,81±2,53 ^a	75,10±5,87 ^{ab}	63,76±0,43 ^b	68,01±0,60 ^{ab}	80,99±3,70 ^{Aa}
MÉDIA 20%	86,72±1,82 ^{Aa}	87,04±0,87 ^a	88,58±0,09 ^a	77,44±1,92 ^b	81,99±0,50 ^{ab}	82,03±3,14 ^{Ab}
MÉDIA 40%	90,96±1,40 ^{Aa}	86,99±0,45 ^{ab}	89,65±0,21 ^a	86,55±0,27 ^{ab}	86,24±0,92 ^{ab}	79,27±4,04 ^{Ab}

As médias seguidas pelas diferentes letras minúsculas nas linha e maiúsculas nas colunas diferem estatisticamente significativamente umas das outras pelo teste de comparação múltipla de Tukey em $P < 0,05$.

Tabela 8 - Compostos Fenólicos Totais das gerações de cervejas.

Reuso (mg GAE/L)	R0	R1	R2	R3	R4	R5
MÉDIA 0%	363,41±4,47 _a	354,65±16,98 ^a	347,21±9,16 ^a	338,29±10,32 ^a	336,98±3,10 ^a	329,77±18,82 ^a
MÉDIA 20%	366,97±11,34 _{ab}	395,97±9,93 ^a	353,02±4,13 ^{bc}	310,01±8,71 ^c	356,59±1,75 ^{bd}	325,73±6,60 ^{cd}
MÉDIA 40%	373,88±4,03 _a	411,40±14,29 ^a	371,47±10,34 ^a	363,64±10,54 ^a	371,16±18,04 ^a	382,02±6,19 ^a

As médias seguidas pelas diferentes letras minúsculas nas linha e maiúsculas nas colunas diferem estatisticamente significativamente umas das outras pelo teste de comparação múltipla de Tukey em $P < 0,05$.

Temos que a análise de DPPH configura a atividade antioxidante presente no meio testado, desta forma, os resultados aqui apresentados em porcentagem na Tabela 6 demonstram o potencial antioxidante das cervejas produzidas.

Podemos inferir, a partir da Tabela 7, que a própria cerveja já possui certo potencial antioxidante por si só, como podemos observar no tratamento de 0% (sem adição de folha), o qual apresenta uma concentração que atinge 80,9% no último reuso, inclusive, tal tratamento demonstra uma constância de valores ao comparar com as reutilizações precedentes. Sendo esses compostos provenientes dos lúpulos e maltes contidos na receita da cerveja, devido a presença de polifenóis com atividade antioxidante.

Ao contrapor tais resultados com os obtidos em tratamentos com adição de *Camellia sinesis* observa-se uma concentração maior desses antioxidantes, mas ao compararmos tais valores entre 20% de adição e 40% de adição a variação de DPPH torna-se pequena, podendo cogitar de que a adição de 40% de folha não demonstrou relevância significativa.

Comparando os valores da quinta geração de levedura e seus respectivos tratamentos com a geração pura (R0), obtemos, conforme apresentado na Tabela 7 em letras maiúsculas, que não houve nenhuma diferença estatística entre esses. Na

análise estatística entre as letras maiúsculas avalia-se apenas a variação entre os extremos das gerações de levedura (R0 e R5), todavia, no suceder das gerações houveram diferenças estatísticas da quantificação de DPPH não apresentadas, podendo então pressupor que essa variação no decorrer do reuso possa ter tido interferência direta ou indireta na vitalidade da levedura, é importante fazer a ressalva que as origens desses compostos antioxidantes são distintas dos tratamos sem folha e com folha, dessa forma, ao utilizar dos dados fornecidos pelas tabelas de análise de DPPH juntamente com a Tabela 8, na qual temos os dados obtidos da análise de Folin, podemos observar o total de compostos polifenólicos presentes na cerveja, observamos uma presença desses compostos em concentrações distintas entre as 3 concentrações de folha.

Observamos na Tabela 8 que não ocorreu variações estatísticas significativa entre as cervejas produzidas sem folha de chá, mantendo-se constante no decorrer do reuso. Enquanto as cervejas produzidas com as folhas apresentaram certa variação no decorrer das produções. O tratamento com 20% de adição de folha, demonstra certo decaimento na concentração, dado que a partir do R2 os valores são iguais estatisticamente até o R5.

Enquanto ao observamos as cervejas produzidas com 40% de adição, conforme demonstra a tabela, também não obtiveram variações expressivas no decorrer das produções.

Essas variações obtidas nas análises de DPPH e compostos fenólicos totais podem ser especuladas que sua causa é decorrente a algumas variações inerentes ao processo, como por exemplo, uma possível produção exacerbada de oxidantes presentes no meio, sendo assim, esses antioxidantes agiram sobre esses oxidantes liberados durante o processo. Desta forma, no tratamento de 40% temos uma quantidade excedente de antioxidantes existentes no meio, sendo possivelmente capaz de estabilizar os oxidantes.

3.4 pH

Tabela 9 - Análise pH

Reuso	R0	R1	R2	R3	R4	R5
MÉDIA 0%	3,99±0,08 ^d	4,06±0,02 ^d	4,18±0,01 ^{cd}	4,45±0,01 ^b	4,72±0,07 ^a	4,35±0,03 ^{bc}
MÉDIA 20%	3,89±0,05 ^b	4,03±0,02 ^b	4,35±0,03 ^{ac}	4,45±0,02 ^a	4,49±0,04 ^a	4,22±0,04 ^c
MÉDIA 40%	4,14±0,20 ^{bc}	4,04±0,01 ^{bc}	4,30±0,03 ^{bd}	5,90±0,01 ^a	4,62±0,02 ^d	4,28±0,03 ^{bd}

As médias seguidas pelas diferentes letras minúsculas nas linha e maiúsculas nas colunas diferem estatisticamente significativamente umas das outras pelo teste de comparação múltipla de Tukey em $P < 0,05$.

Sabemos que o pH possui um papel importante na qualidade da cerveja, principalmente no que diz respeito do controle do pH do mosto que será fermentado conforme abordado na introdução. No entanto, enfatizando no que diz respeito ao pH final da cerveja, este depende em grande parte da capacidade de tamponamento do mosto, do pH inicial do mosto e do crescimento da levedura (GIBSON, B.R. et al. 2007).

Ao final da fermentação, a maioria das cervejas apresentam pH de 4,1 a 4,5, sendo as cervejas a base de trigo um pouco menor. O resultado final do pH obtido em uma cerveja é em grande parte decorrente a fermentação realizada pela levedura, a qual libera prótons de H^+ no meio (Bamforth C. W., 2001).

Sendo assim, observando os valores obtidos e apresentados na tabela 10, percebemos que, salve raras exceções, as cervejas produzidas mantiveram-se dentro da faixa de pH esperada.

A cunho de comparação, em pesquisa de SCHUINA, G. L., et al. (2014) a qual realizaram a produção de cervejas com substituição de lúpulo em 50 e 100% por *Camelia sinensis*, os pH obtidos foram 4,84 e 3,83, respectivamente. Observamos que em ambos os tratamentos com folhas de chá verde do presente trabalho obteve uma melhor faixa de pH conforme o referencial citado anteriormente.

3.5 EBC

Tabela 10 - EBC

Reuso	R0	R1	R2	R3	R4	R5
MÉDIA 0%	21,3±0,9 ^{aA}	19,4±0,9 ^{ab}	17,1±1,9 ^{abc}	15,0±0,7 ^{bcd}	12,6±0,7 ^{cd}	11,7±0,6 ^{dC}
MÉDIA 20%	17,9±1,1 ^{aAB}	18,9±1,9 ^a	18,9±2,5 ^a	14,1±1,7 ^a	12,0±0,5 ^a	15,3±1,4 ^{aBC}
MÉDIA 40%	19,5±0,9 ^{aAB}	17,6±0,9 ^a	17,6±1,3 ^{ab}	14,0±1,3 ^{abd}	10,5±0,1 ^{cd}	15,8±1,7 ^{abcBC}

As médias seguidas pelas diferentes letras minúsculas nas linha e maiúsculas nas colunas diferem estatisticamente significativamente umas das outras pelo teste de comparação múltipla de Tukey em $P < 0,05$.

Averiguamos com a Tabela 9 acima que as adições de folhas interferiram na cor da cerveja, mas que houveram variações no decorrer das produções até mesmo das cervejas sem adição de folhas, isso talvez tenha ocorrido dado ao tempo de armazenamento dos maltes, pois foram adquiridos todos em uma única compra e mesmo lote, o mesmo se aplica para as folhas do chá para evitar possíveis variações de safra, e ambos ingredientes foram devidamente armazenados e vedados, mas possivelmente perderam suas características organolépticas no decorrer do armazenamento. Além das variáveis possíveis durante a produção do mosto em

decorrência de erros aleatórios que possam ter ocorrido, como uma maior extração de determinados açúcares e outros fatores.

De acordo com Beer Judge Certification Program (BJCP, 2021) as cervejas summer ales possuem um EBC no intervalo de 15,7 a 27,6, desta forma, podemos observar que ainda assim apesar das diferenças apresentadas, as cervejas se encontram em grande maioria dentro dos parâmetros estabelecidos. Os valores divergentes do BJCP encontram-se principalmente nas últimas produções de cervejas, ratificando a hipótese de perdas físico-químicas dos grãos utilizados no decorrer do processo.

Conforme demonstrado na Tabela 9, através da análise estatística entre os reúsos R0 e R5, apresentados com letra maiúscula na tabela, nota-se que as cervejas com adição da folha em ambas concentrações apresentam similaridade entre elas em R0 e R5, e também no quinto reúso, apresenta equiparidade também com a cerveja sem adição das folhas. O que corrobora uma baixa interferência na cor da cerveja, independente da presença e concentração das folhas de *C. sinensis*.

4. Discussão

Suhre, T. (2014), em sua pesquisa avaliou a vitalidade de leveduras WLP500 por quatro gerações, obtendo uma diferença estatística da primeira geração com as demais, enquanto no vigente trabalho, o tratamento 0% apresenta semelhanças estatísticas exceto pelo último reúso. Já o de 20% o primeiro reúso (R1) possui similaridade com o R0 e o restante assemelha-se com R5. Já o tratamento com 40% não apresenta um padrão aparente, mas até o penúltimo reúso ainda há equiparidade estatística com o R0, conforme apresentado na Tabela 5.

Acredita-se que essas divergências entre os trabalhos, estão relacionadas com metodologia de ambos, uma vez que o trabalho citado utilizou meio de cultura para a elaboração da pesquisa, além de proveniências e cepas distintas de leveduras utilizadas.

Ainda no trabalho de Suhre T. (2014) a vitalidade apresentada em algumas cervejas em 4ª geração foi de 0,6 de leveduras provenientes de cervejas conhecida como Pilsen, valor o qual não está demasiadamente distante de alguns resultados aqui apresentados.

Ademais, a escolha das porcentagens de substituição de folhas de *C. sinensis* utilizadas neste trabalho utiliza-se de referencial outros estudos que substituíram o lúpulo pela folha de chá verde em maiores concentrações (50% e 100%) como o caso de Schuina G. L. (2017), no qual obtiveram alto grau de turbidez em cervejas com total substituição, além de valores de pH inferiores a 3,83, indicando, conforme concluído pelos pesquisadores, uma possível contaminação bacteriana, logo, a concentração utilizada em nossa pesquisa demonstra ser mais apropriada para não perdemos características fundamentais e inerente a cerveja.

Em sua pesquisa, Guglielmotti M. et al. (2020) substituem parcial e integralmente o lúpulo por folhas de oliveira, justificando o uso destas pelo caráter amargo e também com alta atividade antioxidante, averiguando a influência desses compostos na cerveja durante o tempo de prateleira da mesma (shelf-life), dado que a diminuição do shelf-life de uma cerveja ocorre principalmente pela oxidação e turbidez. Aspecto o qual também é interessante de ser avaliado em futuros estudos com a utilização das folhas de *C. sinensis*, averiguando sua possível interferência no tempo de armazenamento da cerveja, em decorrência dos compostos antioxidantes presentes.

Em pesquisa de Kosiv, R. (2021), na qual avaliaram a eficiência de diferentes gerações levedura aplicando-a em diferentes gravidades de mostos (12 °P, 15°P e 18 °P), notaram que o teor alcoólico não foi dependente da geração da levedura utilizada. Enquanto o valor do pH tendeu a aumentar, juntamente a coloração, no decorrer das gerações. O que comparado com nossa pesquisa, o mesmo ocorreu para os valores de pH, mas a coloração não obteve demasiada distinção entre as gerações. As variações obtidas no estudo citado foram maiores a partir da sétima geração, o que podemos usar como respaldo para manter o reúso do vigente trabalho em até 5 ou 6 gerações.

Kosiv, R. (2021), apresenta em seu trabalho a importância e influência da concentração de glicogênio presente na levedura em relação a uma boa performance durante a fermentação, pois essa reserva energética é relevante para o início da fermentação em uma reutilização de levedura. Acredita-se que um bom reúso de levedura, a cultura deve conter uma concentração superior a 95% de viabilidade de células e ao menos 75% de glicogênio, possibilitando uma fermentação completa. E depreendemos dos resultados do artigo citado, que mesmo tendo gerações com alta viabilidade de células, a diminuição de glicogênio no decorrer do processo é mais expressivo. Podendo utilizar de comparação com o vigente trabalho, o qual apresenta

valores elevados e, de certa forma, constantes no que diz respeito a viabilidade, mas acompanhado do decaimento da vitalidade das células.

5. Conclusão

Em síntese, notamos que a presença das folhas de *Camellia sinensis*, obtidas para a produção de chá verde, demonstrou interferência nas leveduras reutilizadas para a fabricação de cervejas do estilo summer ale no decorrer de 5 gerações. Demonstrando, conforme apresentado, um poder de atenuação elevado do mosto no decorrer da reutilização, podendo cogitar o emprego dessas folhas de forma intercalada no decorrer das fabricações na concentração de 20% de substituição, pois foi a qual apresentou melhores resultados e estabilidade, obtendo então maiores valores de poder de atenuação e acidificação do meio, os quais foram revelados entre R2 e R3, podendo ainda em pesquisas posteriores, averiguar o uso da folha de maneira intercalada e sua influência na vitalidade da levedura em mais de 10 reutilizações, por exemplo.

Recordando que se trata de uma folha de chá amplamente utilizada e consumida ao redor do globo, inclusive de valor comercial inferior ao quilo do lúpulo, contendo diversos componentes antioxidantes em sua composição que apresentam interferência na vitalidade e qualidade da levedura no decorrer do tempo. Retomando a possibilidade de futuros estudos com a folha para averiguar sua interferência a longo prazo, em shelf-life.

Uma análise interessante para empregar em estudos futuros, para melhor avaliar o aspecto da vitalidade da levedura é o de quantificação de glicogênio. Além de buscar outras técnicas alternativas de vitalidade para cunho de comparação e elucidação dos resultados obtidos até então.

6. Referência

10 países que mais beberam e compraram cerveja no mundo em 2017. **Forbes**. 20 de janeiro de 2018 Disponível em: <https://forbes.com.br/listas/2018/01/10-paises-que-mais-bebem-e-compram-cerveja>

ASBC Methods of Analysis, online. Beer 10. Spectrophotometric Color Method Approved 1958, rev. 2015. American Society of Brewing Chemists, St. Paul, MN, U.S.A: 10.1094/ASBCMethod-Beer10

ARCHANA, K. M., RAVI, R., ANU-APPAIAH, K. A. (2015). Correlation between ethanol stress and cellular fatty acid composition of alcohol producing non-Saccharomyces in comparison with *Saccharomyces cerevisiae* by multivariate techniques. **Journal of Food Science and Technology**, 52(10), 6770–6776. doi:10.1007/s13197-015-1762-y

BAMFORTH, C. W. (2001). pH in brewing: An overview. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas** 38: 1–9.

BLEOANCA, I., SILVA, A. R. C., PIMENTEL, C., RODRIGUES-POUSADA, C., & MENEZES, R. DE A. (2013). Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 116(6), 697–705. doi:10.1016/j.jbiosc.2013.05.037

CAMARGO, L. E. A. et al., (2016). Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. **Brazilian Journal of Biology**, 76(2), 428–434. doi:10.1590/1519-6984.18814

FERREIRA, I. M. P. L. V. O. et al., (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, 21(2), 77–84. doi:10.1016/j.tifs.2009.10.008

GIBSON, B.R. et al., (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. **FEMS Microbiology Reviews**, 31: 535-569. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>

HARRISON, M. A., ALBANESE, J. B. (2017). *Beer/Brewing - Reference Module in Life Sciences*. doi:10.1016/b978-0-12-809633-8.13014-6

KAKA, B., SIMPSON, W., HAMMOND J. (1988) Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 94, p. 153-158.

KARORI, S, M., WACHIRA, F, N., WANYOKO, J, K. (2007). Antioxidant capacity of different types of tea products. **African Journal of Biotechnology**, 6(19), 2287–2296. doi:10.5897/ajb2007.000-2358

KORDIALIK-BOGACKA E., DIOWKSZ A. (2013): Physiological state of reused brewing yeast. **Czech J. Food Sci.**, 31: 264-269.

KOREN, D. et al., (2019). Study of antioxidant activity during the malting and brewing

process. **Journal of Food Science and Technology**. doi:10.1007/s13197-019-03851-1

MAGALHÃES, P. J., et al. (2016). The impact of xanthohumol on a brewing yeast's viability, vitality and metabolite formation. **Journal of the Institute of Brewing**, 122(2), 363–363. doi:10.1002/jib.310

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 65, DE 10 DE DEZEMBRO DE 2019. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Publicado em: 11/12/2019. Edição: 239. Seção 1. Página: 31. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A Cerveja no Brasil. Agosto de 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/publicacoes/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/view>

MEGA, J.F., NEVES, E. E ANDRADE, C.J. (2011). A produção da cerveja no brasil [Beer production in Brazil], **CITINO - Ciência, Tecnologia, Inovação e Oportunidade**, Vol. 1 No. 1, pp. 1-6

NISHIYAMA, M. F. et al., (2010) Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, supl. 1, p.191-196, May 2010. Available from

PINHO, O., FERREIRA, I. M. P. L. V. O., SANTOS, L. H. M. L. M. (2006). Method optimization by solid-phase microextraction in combination with gas chromatography with mass spectrometry for analysis of beer volatile fraction. **Journal of Chromatography A**, 1121, 145e153

POWELL, C., QUAIN, D., & SMART, K. (2003). The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. **FEMS Yeast Research**, 3(2), 149–157. doi:10.1016/s1567-1356(03)00002-3

RETO, M. et al., (2007). Chemical Composition of Green Tea (*Camellia sinensis*) Infusions Commercialized in Portugal. **Plant Foods for Human Nutrition**, 62(4), 139–144. doi:10.1007/s11130-007-0054-8

RUFINO, M. S. M. et al., (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 8 non-traditional tropical fruits from Brasil. **Food Chemistry**, v. 121, p. 996-1002.

SCHUINA, G. L., et al. (2017). Avaliação do potencial de utilização de chá verde como substituto parcial ou total de lúpulo em cerveja tipo pilsner. **Revista latino-americana**

de cerveja, 89065, 52.

SMART, K. A. et al., (1999). Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v57(1), 18–23. doi:10.1094/asbcj-57-0018

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A. Jr., AMER. J; (1965) Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents.; **Enol. Viticult.** v.16,p. 144-158;

SPÁČIL, V., TEICHMANNOVÁ, A. (2016) Intergenerational Analysis of Consumer Behaviour on the Beer Market. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v.220, p.487-495.

doi:10.1016/j.sbspro.2016.05.524

SUBHASWARAJ, P. et al., (2017). Determination of antioxidant activity of Hibiscus sabdariffa and Croton caudatus in Saccharomyces cerevisiae model system. **Journal of Food Science and Technology**, 54(9), 2728–2736. doi:10.1007/s13197-017-2709-2

WALKER, G. M., & BASSO, T. O. (2019). Mitigating stress in industrial yeasts. *Fungal Biology*. doi:10.1016/j.funbio.2019.10.010

WAUTERS, R., BRITTON, S. J., VERSTREPEN, K. J. (2021). *Old yeasts, young beer—The industrial relevance of yeast chronological life span*. **Yeast. Portico**. <https://doi.org/10.1002/yea.3650>

WHITE, C. ZAINASHEFF, J. (2010) Yeast: the practical guide for beer fermentation. **Brewers publications**. p. 138.

ZANETTA, L.D. et al., (2020), Hedonic, emotional and willingness-to-pay response to beers of a different type in Brazil, **British Food Journal**, Vol. ahead-of-print No. ahead-of-print. doi.org/10.1108/BFJ-02-2020-0137

ZHAO H., CHENA W., LUB J., ZHAO M. (2010). Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers, **Food Chemistry**, 119, 1150-1158.