



**Universidade de  
Aveiro  
2020**

Departamento de Química

**Tiago Miguel Martins  
Tavares**

**Desenvolvimento de uma nova cerveja em contexto  
microcervejeiro**



**Tiago Miguel Martins  
Tavares**

**Desenvolvimento de uma nova cerveja em contexto  
microcervejeiro**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço, Professora Auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Eng.º Nicolas Jean-Louis Billard, Sócio-Gerente da Empresa Essência D'Alma Lda.

Dedico este trabalho à minha família e amigos por todo o apoio.

**o júri**

**presidente**

**Prof. Doutora Luísa Alexandre Seuanes Serafim Martins Leal**  
professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**arguente**

**Prof. Doutora Marcela Alves Segundo**  
professora auxiliar da Universidade do Porto

**orientador**

**Prof. Doutora Sílvia Maria da Rocha Simões Carriço**  
professora auxiliar com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Primeiramente, gostaria de agradecer à Universidade de Aveiro e à empresa Essência D'Alma, Lda. pela oportunidade que me proporcionaram de realizar este estágio curricular em ambiente empresarial. Foi uma experiência bastante enriquecedora e que me permitiu expandir os meus conhecimentos, contribuindo também para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Agradeço aos meus orientadores, Professora Doutora Sílvia M. Rocha e Engenheiro Nicolas Billard, por todo o apoio prestado e conhecimento transmitido ao longo desta etapa.

Agradeço também a todo o staff da empresa Essência D'Alma, Lda. pela forma como me acolheram e integraram na equipa, pelas amizades que ali se criaram e por todo o conhecimento transmitido.

Por fim, agradeço à minha família, pais e irmão, e a todos os meus amigos, que me apoiaram e estiveram presentes no decorrer de todo este projeto.

**palavras-chave**

Cerveja, Processo Cervejeiro, *Dry Hopping*, Carbonatação, Desenvolvimento de novos produtos, Cerveja *Brut*

**resumo**

Este estágio foi efetuado em ambiente empresarial, nomeadamente na empresa Essência D'Alma, proprietária da marca de cerveja artesanal Vadia. De forma a crescer, evoluir e expandir o negócio, a empresa depara-se com a constante necessidade em desenvolver e introduzir novos produtos no mercado. Desta forma, os objetivos centrais deste estágio curricular passavam, primeiramente, pela aquisição de novas experiências e competências profissionais, assim como pelo desenvolvimento de uma nova cerveja, neste caso uma cerveja *Brut* IPA.

Grande parte deste trabalho destinou-se à realização de atividades diárias da empresa, que englobaram diversas etapas referentes a todo o processo cervejeiro, assim como o controlo e monitorização de alguns parâmetros físico-químicos dos produtos e a medição da viabilidade e concentração celular das leveduras. A efetuação destas atividades teve uma enorme importância na aquisição de conhecimentos, que foram essenciais para o posterior desenvolvimento da nova cerveja.

O desenvolvimento da nova bebida iniciou-se através de uma análise cuidada acerca das tendências no setor alimentar, com foco no mercado cervejeiro artesanal. Posto isto, optou-se pela ideia de desenvolver uma cerveja *Brut* IPA, que conjugava características de vinhos espumantes e cerveja. Na fase seguinte, procedeu-se ao desenvolvimento da formulação do produto, em colaboração com a cervejaria brasileira Albanos e com o auxílio do software cervejeiro *BeerSmith*. Finalmente, deu-se a produção de cerca de 1000 L de mosto, com a obtenção de dois produtos distintos. O primeiro (*Brut* IPA 1) carbonatado mecanicamente e o segundo (*Brut* IPA 2) sujeito ao processo de refermentação em garrafa, com a consequente carbonatação natural do mesmo.

Ambos os produtos foram analisados, quanto aos seus parâmetros físico-químicos, com a *Brut* IPA 1 a apresentar um pH final de 3,80, teor de sólidos solúveis de 4,7 °Brix e uma concentração de oxigénio dissolvido entre os 55 e os 65 ppb, antes do enchimento. Em relação à *Brut* IPA 2, o pH antes da refermentação encontrava-se nos 3,85, com um teor de sólidos solúveis de 6,8 °Brix.

Por último, os principais objetivos deste trabalho foram atingidos, porém, devido às circunstâncias provocadas pela situação pandémica, a caracterização dos produtos finais não foi concluída.

**keywords**

Beer, Brewing Process, Dry Hopping, Carbonatation, New product development, Brut Beer

**abstract**

This internship was carried out in a business environment, specifically in the company Essência D'Alma, owner of the craft beer brand Vadia. In order to grow, evolve and expand the business, the company is confronted with the continuous necessity to develop and introduce new products in the market. In this manner, the objectives of this curricular internship were primarily, the acquisition of new experiences and professional competences, along with the development of a new beer, in this instance a Brut IPA.

A large part of this work was dedicated to carrying out the daily activities of the company, which included several stages related to the brewing process, along with the control and monitoring of some physicochemical parameters of the products and the measurement of the viability and concentration of yeast cells. The execution of such activities had an enormous importance in the acquisition of knowledge, which was essential for the subsequent development of the new beer.

The development of the new beverage started with a meticulous analysis of trends in the food sector, focussing on the craft beer market. Therefore, the idea of developing a Brut IPA, which combined characteristics of sparkling wines and beer, was selected.

In the following stage, the product formulation was developed in collaboration with the Brazilian brewery Albanos and with the assistance of the *Beersmith* brewing software. Afterwards, about 1000 L of wort were produced, obtaining two distinct products. The first (*Brut IPA 1*), mechanically carbonated, and the second (*Brut IPA 2*), submitted to a refermentation process in the bottle, with the resulting natural carbonation.

Both beers were tested for their physicochemical parameters, with Brut IPA 1 presenting a final pH of 3.80, soluble solids content of 4.7 °Brix and a dissolved oxygen concentration between 55 and 65 ppb, before the filling stage. Regarding Brut IPA 2, the pH prior refermentation was 3.85, with a soluble solids content of 6.8 °Brix. All in all, the main purposes of this work were attained, although, due to the circumstances caused by the pandemic situation, the end products characterisation was not completely fulfilled.

# Índice

Siglas e Abreviaturas .....	i
Índice de Figuras .....	iii
Índice de Tabelas .....	v
<b>Capítulo I - Introdução.....</b>	<b>1</b>
1 Contextualização e Objetivos do Trabalho .....	1
1.1 Enquadramento histórico da cerveja .....	2
1.2 Matérias primas da cerveja .....	4
1.2.1 Água .....	4
1.2.2 Cereais.....	5
1.2.3 Lúpulo .....	7
1.2.4 Levedura .....	13
2 Processo cervejeiro.....	16
2.1 Moagem .....	17
2.2 Brassagem.....	17
2.3 Filtração do mosto .....	19
2.4 Ebulição .....	20
2.5 Clarificação, arrefecimento e aeração do mosto.....	21
2.6 Fermentação.....	22
2.7 Maturação .....	25
2.8 Filtração da cerveja.....	27
2.9 Carbonatação .....	28
2.10 Enchimento .....	29
<b>Capítulo II - Realização de atividades diárias na empresa .....</b>	<b>30</b>
1. Atividades diárias na empresa.....	30
1.1 Procedimentos.....	30
1.1.1 <i>Dry Hopping</i> .....	31
1.1.2 Filtração .....	32
1.1.3 Carbonatação.....	34
1.1.4 Higienização dos equipamentos.....	36



1.1.5	Análise dos parâmetros físico-químicos das cervejas em cuba .....	37
1.1.6	Determinação da viabilidade e concentração celular das leveduras .....	39
1.2	Resultados e discussão .....	41
1.2.1	<i>Dry Hopping</i> .....	41
1.2.2	Filtração .....	41
1.2.3	Carbonatação.....	42
1.2.4	Análise dos parâmetros físico-químicos das cervejas em cuba .....	43
1.2.5	Determinação da viabilidade e concentração celular das leveduras .....	45

### **Capítulo III – Desenvolvimento de uma Nova Cerveja em contexto microcervejeiro**

.....		<b>47</b>
1.	Definição de Novo produto e o seu ciclo de vida .....	47
2.	A importância e o processo de desenvolvimento de novos produtos.....	48
3.	Desenvolvimento estruturado de uma nova cerveja.....	51
3.1.	Análise do mercado alimentar e cervejeiro, com foco em Portugal .....	52
3.1.1.	Cervejas <i>Brut</i> .....	55
3.2.	Triagem de ideias .....	56
3.3.	Determinação da viabilidade da nova bebida: Definição do conceito .....	57
3.4.	Testes de formulação .....	59
3.5.	Produção da cerveja .....	59
4.	Análises e caracterização do produto.....	63
4.1.	Metodologias para a análise e caracterização do produto .....	63
4.1.1.	Análise aos parâmetros físico químicos da cerveja .....	63
4.1.2.	Análise sensorial .....	65
4.1.3.	Análise da composição volátil dos produtos.....	66
4.2.	Resultados e discussão .....	68
4.2.1.	Análise aos parâmetros físico químicos da cerveja ao longo da sua produção	68
4.2.2.	Análise sensorial .....	71
4.2.3.	Análise da composição volátil dos produtos.....	75
<b>Conclusões</b> .....		<b>77</b>
<b>Referências</b> .....		<b>79</b>
<b>Anexos</b> .....		<b>83</b>

## Siglas e Abreviaturas

<i><b>Sigla</b></i>	<i><b>Significado em Português</b></i>	<i><b>Significado em Inglês</b></i>
<b>ADP</b>	Adenosina difosfato	-
<b>APVC</b>	Associação Portuguesa dos Produtores de Cerveja	-
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato	-
<b>BJCP</b>	-	Beer Judge Certification Program
<b>CAGR</b>	Taxa de crescimento anual composta	Compound Annual Growth Rate
<b>CCV</b>	Cuba cilíndrica	Cylindroconical Vessel
<b>CIP</b>	-	Clean In Place
<b>DHAP</b>	Dihidroxiacetona fosfato	-
<b>DMS</b>	Sulfureto de dimetilo	-
<b>EBC</b>	Convenção Europeia do Fabrico de cerveja	European Brewery Convention
<b>EFSA</b>	Autoridade Europeia para a segurança alimentar	European Food Safety Authority
<b>FTU</b>	Unidades de Turbidez Formazina	Formazin Turbidity Units

<b>GC-MS</b>	Cromatografia Gasosa-Espetrometria de massa	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
<b>HS-SPME</b>	Microextração em fase sólida em espaço de cabeça	Headspace Solid Phase Microextraction
<b>IBU</b>	Unidade de Amargor Internacional	International Bittering Unit
<b>IPA</b>	-	India Pale Ale
<b>LDO</b>	-	Luminescent Dissolved Oxygen
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde	-
<b>PMEs</b>	Pequenas e Médias empresas	-
<b>R&amp;D</b>	Investigação e Desenvolvimento	Research and Development
<b>SMM</b>	S-Metil-Metionina	-
<b>TCA</b>	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos	Tricarboxylic acid cycle

## Índice de Figuras

<b>Figura 1</b> – Estrutura interna de um grão de cevada. Adaptado de (8). .....	6
<b>Figura 2</b> – Estrutura da flor do lúpulo. Adaptado de (10).....	8
<b>Figura 3</b> – Estruturas dos principais $\alpha$ -ácidos e $\beta$ -ácidos do lúpulo. Adaptado de (11). .....	9
<b>Figura 4</b> – Classificação dos principais compostos que constituem os óleos essenciais do lúpulo. Adaptado de (2). .....	10
<b>Figura 5</b> – Estrutura química dos principais óleos essenciais em cada um dos grupos: (a) Terpenos, (b) Compostos oxigenados e (c) Compostos de enxofre. Adaptado de (12). .....	11
<b>Figura 6</b> – Estruturas químicas dos principais polifenóis do lúpulo: (A) flavonóis, (B) ácidos fenolcarboxílicos, (C) flavan-3-óis, (D) prenilflavonóides. Adaptado de (11).12	12
<b>Figura 7</b> – Representação esquemática do (a) processo de ativação das proteínas floculinas pelos íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), resultando no (b) processo de floculação das leveduras pela interação das floculinas com os resíduos de manose na parede celular. Adaptado de (13).....	14
<b>Figura 8</b> – Via de repressão pela glucose na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Adaptado de (14). .....	15
<b>Figura 9</b> – Representação esquemática do processo cervejeiro. À esquerda estão representados os materiais adicionados ao longo do processo. À direita representados os materiais retirados ao longo do mesmo. Adaptado de (5). .....	16
<b>Figura 10</b> - Representação dos patamares de temperatura realizados durante o processo de brassagem, com a respectiva sequência de ativação enzimática ao longo do tempo. ...	19
<b>Figura 11</b> – Reação de isomerização dos $\alpha$ -ácidos do lúpulo, resultando nos respectivos $\alpha$ -ácidos durante a etapa de ebulição do mosto. Adaptado de (11). .....	21
<b>Figura 12</b> –Representação esquemática do metabolismo da glucose na levedura. Retirado de (8). .....	24
<b>Figura 13</b> – Mecanismo de formação de diacetilo e reabsorção do mesmo por parte da levedura. Adaptado de (2).....	26
<b>Figura 14</b> –Sistema utilizado durante o processo de <i>Dry Hopping</i> . .....	31

<b>Figura 15</b> - Sistema de filtração por cartuchos utilizado na empresa. ....	33
<b>Figura 16</b> – Equipamento utilizado para a filtração por terras. (A) reservatório destinado à deposição das terras. (B) filtro de terras. Adaptado de (25). ....	34
<b>Figura 17</b> – Sistema utilizado para a carbonatação dos produtos.....	35
<b>Figura 18</b> - Sistema de recirculação dos produtos de limpeza e desinfecção na cuba. ....	37
<b>Figura 19</b> - Representação esquemática de uma câmara de contagem Neubauer, com as zonas de contagem de células ao microscópio ótico salientadas a vermelho. ....	40
<b>Figura 20</b> - Representação esquemática do ciclo de vida de um produto no mercado. Adaptado de (23).....	48
<b>Figura 21</b> - Representação esquemática do processo de Desenvolvimento de Novos Produtos. Adaptado de (33). ....	51
<b>Figura 22</b> – Processo de fabrico da cerveja Brut IPA.....	62
<b>Figura 23</b> – Representação esquemática do funcionamento da tecnologia LDO. Adaptado de (46). ....	65
<b>Figura 24</b> – Classificação desejada para as características da cerveja Brut IPA, tendo em conta uma escala de 1 a 5, em que 1 representa o nível mínimo e 5 o nível máximo. ....	72
<b>Figura 25</b> – Página 1 da possível ficha descritiva a utilizar para as avaliações sensoriais da cerveja desenvolvida.....	73
<b>Figura 26</b> – Página 2 da possível ficha descritiva a utilizar para as avaliações sensoriais da cerveja desenvolvida.....	74
<b>Figura 27</b> – Análise por HS-SPME/GC-MS da composição volátil do lúpulo da variedade Cascade, utilizado nos processos de <i>Dry Hopping</i> da cerveja. Retirado de (53).....	76

## Índice de Tabelas

Tabela 1 – Resultados das medições da turbidez obtidos antes e depois do processo de filtração das cervejas., com $T_i$ a corresponder à turbidez inicial e $T_f$ à turbidez final dos produtos.....	42
Tabela 2 – Resultados das análises efetuadas à cerveja Vadia Trigo (C002) produzida durante o mês de Janeiro, com a respetiva percentagem de atenuação. ....	44
Tabela 3 – Resultados das análises efetuadas à cerveja Vadia Rubi (B145) produzida durante o mês de Dezembro, com a respetiva percentagem de atenuação. ....	45
Tabela 4 – Resultados das análises de viabilidade (% células vivas) e concentração celular ( $n^\circ$ de células vivas/L de suspensão) de suspensões de leveduras recuperadas e armazenadas a baixa temperatura, com $f_d$ a corresponder ao fator de diluição aplicado a cada amostra.....	46
Tabela 5 – Resultados das medições de pH, teor de sólidos solúveis ( $^\circ$ Brix) e potencial alcoólico (%vol/vol) do produto ao longo dos meses de Novembro e Dezembro de 2019.....	68
Tabela 6 – Resultados das medições do pH e teor de sólidos solúveis ( $^\circ$ Brix) da bebida ao longo dos meses de Março e Abril de 2020.....	69
Tabela 7 – Resultados relativo à turbidez do produto antes e após a realização das etapas de filtração por terras e <i>dry hopping</i> , com $T_i$ a corresponder à turbidez inicial e $T_f$ à turbidez final. ....	70
Tabela 8- Resultados das medições à concentração de oxigénio dissolvido (OD) na cerveja, em ppb, antes e após a realização das etapas de filtração por terras, <i>dry hopping</i> e carbonatação. ....	71

# Capítulo I - Introdução

## 1 Contextualização e Objetivos do Trabalho

O mercado cervejeiro apresenta uma enorme diversidade, apresentando uma extensa variedade de estilos de cerveja. As matérias primas utilizadas, assim como etapas e métodos realizados ao longo de todo o processo cervejeiro podem variar e vão afetar decisivamente as propriedades organoléticas do produto final. Desta forma, tendo em conta a crescente procura por cerveja artesanal, associada com a vontade dos consumidores em experienciar novos produtos, o setor cervejeiro depara-se com a procura constante pela inovação, associada ao desenvolvimento de novas cervejas.

Este trabalho foi desenvolvido em ambiente empresarial, nomeadamente na empresa Essência D'Alma Lda., proprietária da marca de cerveja artesanal Vadia, no âmbito do estágio curricular. A cerveja artesanal Vadia é uma das marcas artesanais mais antigas em Portugal, tendo sido uma das impulsionadoras do movimento artesanal no país desde 2007. A empresa teve origem num interesse comum de três amigos pela cerveja, que em meados de 2007 iniciaram a conceção do seu próprio produto.

Oficialmente, a empresa sedeadada em Ossela, no concelho de Oliveira de Azeméis, foi fundada em Outubro de 2010, sendo detentora da marca de cerveja artesanal Vadia e pioneira no mercado de cerveja artesanal em Portugal.

No final de 2015, tendo em conta o crescimento ininterrupto desde a sua fundação, a empresa optou por mudar de instalações, passando para uma área de 1000 m<sup>2</sup>, dos quais 250 m<sup>2</sup> correspondem à área de produção cervejeira. Com esta mudança a capacidade de produção aumentou significativamente, com a empresa a passar a ser capaz de produzir cerca de 1 milhão de litros de mosto por ano e fermentar um valor próximo de 30 mil litros de cerveja mensalmente.

Atualmente, a marca Cerveja Vadia é comercializada por todo o país, possuindo em catálogo cinco gamas de produtos diferentes: a gama original, constituída por cervejas do estilo *German Pilsner*, *Wheat Beer*, *Dark Lager* e *Märzen*; a gama harmonização, composta por cervejas do estilo *Fruited Lager*, *Doppelbock*, *American Pale Ale*, *India Pale Ale* e *Baltic Porter*; a gama especial, a qual pertencem cervejas do estilo *Portuguese Grape Lager* e *Sour*; a gama sem álcool, com uma cerveja do estilo *Lager* e a gama sidra, constituída por sidras

de maçã e pêra. A marca é reconhecida nacional e internacionalmente, tendo já conquistado várias medalhas em concursos internacionais, como no *World Beer Awards* e *World Cider Awards*.

Deste modo, este estágio curricular em ambiente microcervejeiro, teve como principais objetivos, primeiramente, a aquisição de conhecimentos e competências através do contacto direto com as matérias primas e etapas ao longo de todo o processo cervejeiro, para a posterior aplicação dessas mesmas competências no desenvolvimento de um novo produto, mais especificamente, uma cerveja *Brut IPA*. Por último, teve como desígnio a realização de um estudo para a aferição do impacto do tipo de encapsulamento da cerveja (carica metálica ou rolhas de cortiça) no envelhecimento/maturação do produto em garrafa. Atendendo às circunstâncias provocadas pela situação pandémica vivenciada no decorrer deste estágio curricular, a conclusão deste último ponto não foi possível, no entanto este relatório contém informação de suporte para a realização do mesmo.

## **1.1 Enquadramento histórico da cerveja**

A cerveja é um produto milenar, sendo uma das bebidas alcoólicas mais antigas da humanidade. Estima-se que a sua origem tenha ocorrido há mais de 6000 anos, coincidindo provavelmente com o surgimento do pão. Ao longo da história, a cerveja foi evoluindo, acompanhando o desenvolvimento das civilizações e, por sua vez, o processo cervejeiro foi-se tornando cada vez mais rigoroso e sofisticado, com a obtenção de um produto cada vez mais estável, de acordo com o objetivo final.<sup>1</sup>

Com a domesticação de animais e o domínio de algumas técnicas de cultivo, o ser humano começou a estabelecer-se em povoados, em detrimento de um estilo de vida nómada. A agricultura tornou-se cada vez mais importante, com os cereais a desempenharem um papel de grande destaque, devido à facilidade de cultivo, armazenamento e por constituírem uma excelente fonte energética. Com base em evidências arqueológicas, a produção de bebidas fermentadas à base de grãos de cereais terá começado nas regiões do Egipto e Mesopotâmia, onde sedimentos de cerveja foram encontrados em vasos. Vários manuscritos da época dinástica (3100-2686 a.C.) reportam a grande importância cultural que a cerveja já desempenhava nessa altura, podendo concluir-se que a origem desta bebida terá antecedido este período, muito provavelmente na era pré-dinástica.<sup>1</sup>



No antigo Egípcio, a cerveja encontrava-se difundida por todos os setores da sociedade, sendo consumida inclusive pelo Faraó e utilizada nas mais variadas cerimónias, como as de cariz religioso (oferendas aos Deuses e cerimónias fúnebres). Acredita-se que a cerveja tenha influenciado grandemente a economia e até mesmo a organização política da sociedade egípcia.<sup>1</sup>

O fabrico de cerveja não tardou a difundir-se por outras partes do planeta, apesar de, culturalmente, não ser a bebida predileta de algumas regiões. Enquanto gregos e romanos demonstravam preferência por outras bebidas, mais concretamente pelo vinho, contemporaneamente, povos germânicos e celtas atribuíam maior relevo à tradição cervejeira. A ocupação Celta pela maior parte da Europa até 500 a.C. levou a que muitos costumes e tradições, incluindo a cervejeira, fossem adotados por estas regiões. Os Celtas foram responsáveis pelo aprimoramento do processo cervejeiro, tendo implementado novas técnicas, entre as quais a secagem dos cereais utilizando temperaturas elevadas (substituindo a secagem ao ar), minimizando assim a contaminação destes por fungos.<sup>1,2</sup>

Posteriormente, durante a idade média, o clero, como classe social com maior nível de instrução, assumiu maior destaque na sociedade, tendo sido responsável pela preservação de muitas tradições e costumes através de manuscritos, incluindo a atividade cervejeira, que era levada a cabo por monges em mosteiros. Atualmente, ainda existem alguns mosteiros Trapistas espalhados por todo o mundo que continuam a produzir cerveja. Para além da manutenção do conhecimento cervejeiro, acredita-se que os monges foram igualmente responsáveis por descrever pela primeira vez a utilização de lúpulo na cerveja.<sup>2</sup> Consta que o lúpulo começou por ser usado por monges germânicos, que perceberam que através da adição desta planta selvagem, a bebida tornava-se mais apelativa em termos de sabor e amargor, para além de atuar como conservante natural, preservando o produto durante mais tempo.<sup>1,2</sup>

Com o decorrer do tempo, o processo cervejeiro tornou-se progressivamente mais profissionalizado, com etapas como a ebulição do mosto, para um melhor aproveitamento das propriedades do lúpulo, a serem introduzidas por países do Norte da Europa. A Holanda teve um papel determinante na dispersão da tradição cervejeira para outros continentes, tendo sido responsável pelo aparecimento da primeira cervejeira Americana. Por outro lado, os britânicos industrializaram o processo cervejeiro, tendo sido os maiores impulsionadores da produção de cerveja a larga escala.<sup>2</sup>

Atualmente, a cerveja é das bebidas mais consumidas em todo o planeta, tendo uma enorme importância cultural em vários países, nomeadamente na Bélgica, onde foi reconhecida em 2016 como Património Imaterial da Humanidade pela UNESCO.<sup>3</sup> Tendo em conta, estatísticas apresentadas pela *The Brewers of Europe*, o setor cervejeiro tem vindo a crescer continuamente, sendo que na União Europeia, em 2018, foram contabilizadas 10 154 cervejeiras ativas, em contraste com as 4849 de 2012. No território português, em 2012, apenas 9 cervejeiras estavam ativas, tendo esse valor, até 2018, aumentado para 120 cervejeiras ativas por todo o país. De realçar, que no referido estudo também foram contabilizadas microcervejarias.<sup>4</sup>

## **1.2 Matérias primas da cerveja**

As matérias primas base para a produção de cerveja são: água, malte (também poderão ser utilizados cereais adjuntos, como trigo e cereais não maltados), lúpulo e levedura. De um modo geral, o processo cervejeiro envolve a extração e quebra de hidratos de carbono presentes no cereal, dando origem a uma solução açucarada, designada por mosto, que desempenha um papel essencial como fonte de nutrientes para o metabolismo da levedura. Durante a fase fermentativa, este microrganismo consome os açúcares simples, produzindo etanol e libertando dióxido de carbono, energia e outros subprodutos metabólicos. Normalmente, o produto final apresenta um valor de pH reduzido (entre os 3,8 e 4,7), sendo constituído por: água (90-94 %), etanol, compostos derivados do lúpulo, dióxido de carbono e uma baixa concentração de oxigénio (<0.1 ppm). A cerveja apresenta também outros compostos minoritários, incluindo um vasto leque de compostos voláteis (0,5%), responsáveis principais pelo aroma e sabor do produto, entre os quais: ácidos orgânicos, ésteres, aldeídos, diacetilo, compostos sulfúricos e terpénicos. Existem ainda outros compostos residuais (4%) como os sais inorgânicos, açúcares não fermentescíveis (D-ribose, L-Arabinose ou D-Xilose), aminoácidos, polifenóis, vitaminas, lípidos e resinas derivadas do lúpulo.<sup>5,6</sup>

### **1.2.1 Água**

A água é o composto maioritário da cerveja, correspondendo a cerca de 90 a 94% do conteúdo da mesma. Como tal, a qualidade desta matéria prima, tendo em conta a sua

composição química e biológica tem um impacto significativo no processo cervejeiro, sendo que estes parâmetros devem ser examinados e controlados de forma recorrente.<sup>2,6,7</sup>

Assim, existem vários requisitos que a água utilizada para a produção de cerveja deve satisfazer, entre os quais: o cumprimento da legislação relativa a água própria para consumo humano, deve ser incolor, neutra em termos de sabor e odor, ausente de agentes patogénicos e de metais pesados, como o manganês.<sup>6</sup>

A água contribui com a maior parte da matéria inorgânica que constitui a cerveja, já que na sua composição apresenta sais dissolvidos, afetando as características da cerveja final, como a acidez e o paladar da mesma. O pH é um fator chave para a produção de cerveja, visto que todo o processo ocorre de forma mais rápida e eficiente num meio mais acidificado, pois o pH ótimo de muitas das enzimas envolvidas em todo o processo encontra-se abaixo de pH neutro.<sup>7</sup> Para além disso, a composição iónica da água utilizada vai também ser importante para a levedura, com a presença de alguns iões, como o zinco (Zn) e o ferro (Fe), a ser essencial para o normal crescimento deste microrganismo. Pelo contrário, a presença em quantidades elevadas de compostos, como nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ), pode ser tóxica para a levedura.<sup>6,7</sup>

### 1.2.2 Cereais

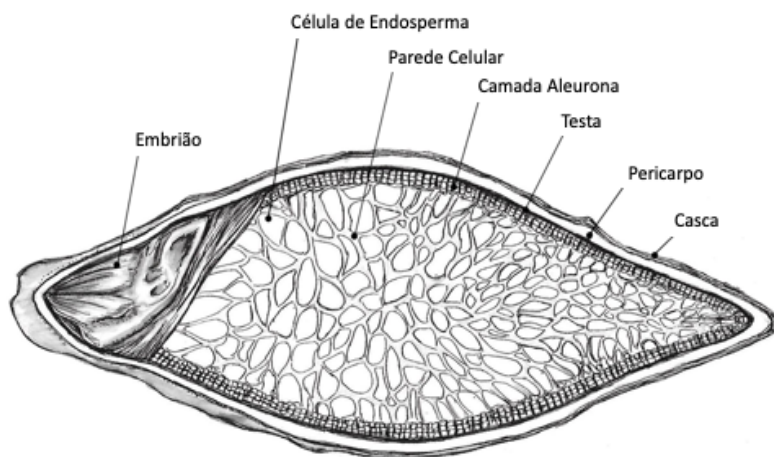
Os cereais funcionam como substrato para o processo fermentativo, desempenhando um papel de enorme importância na cerveja, já que as suas características, como a quantidade de metabolitos disponíveis e a consequente capacidade de conversão dos seus polímeros, influenciam grandemente o produto final. Apesar da crescente popularidade na utilização de cereais não maltados como adjuntos (arroz, milho, sorgo e cevada não maltada), na maioria dos casos, as cervejas são produzidas com pelo menos 70% de cevada maltada.<sup>2</sup>

A cevada, da espécie *Hordeum vulgare*, é uma gramínea (monocotilónea) pertencente à família das *Poaceae*. O processo de maltagem deste cereal tem como propósito a produção de enzimas no grão a germinar e a indução de mudanças na constituição química do mesmo. Este processo inicia-se com a indução da germinação dos grãos de cevada em ambiente húmido, e é finalizado com um processo de secagem, a elevadas temperaturas, após um período de tempo germinativo apropriado. Existem algumas razões para a cevada maltada ser o cereal mais amplamente usado no processo cervejeiro, entre as quais: a maior facilidade de regulação e controlo da germinação; a menor temperatura de gelatinização,

comparando com outros cereais como trigo, milho ou sorgo; e também o preço comparando com outros cereais.<sup>6</sup> Outra das vantagens deste cereal é o facto da casca permanecer no grão após a moagem, facilitando o subsequente processo de filtração do mosto.

Simultaneamente, os grãos de cevada constituem uma excelente fonte de amido, quando comparado com outros cereais, como o trigo ou o milho, sendo este o composto maioritário deste cereal (podendo corresponder até cerca de 65% do seu peso seco do cereal). Para além disso, a cevada maltada apresenta as enzimas hidrolíticas necessárias para a quebra do amido e quantidades mais reduzidas de lípidos e minerais.<sup>2</sup>

Tendo em conta, o papel central que a cevada ocupa no processo cervejeiro, é importante destacar a composição deste cereal mais pormenorizadamente. Na Figura 1<sup>8</sup>, é possível identificar as várias secções que compõem o grão de cevada.



**Figura 1** – Estrutura interna de um grão de cevada. Adaptado de (8).

A estrutura interna dos grãos de cevada está segmentada em três partes: a região do embrião, o endosperma e as camadas protetoras do grão (camada aleurona, testa, pericarpo e casca).

O endosperma é constituído por células que contêm os grânulos de amido essenciais para a cerveja. Como referido anteriormente, o amido é o constituinte maioritário da cevada, podendo equivaler até 65% da composição do grão. Este polissacarídeo é formado por dois polímeros diferentes: amilose e amilopectina. Ambas as estruturas são compostas por unidades de glucose, no entanto a amilose apresenta uma cadeia linear constituída apenas por ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, enquanto a amilopectina, para além das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4, apresenta também ramificações através de ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6. Existem ainda

outros açúcares na composição da cevada, com cerca de 2 % da cevada a corresponder a açúcares simples como a sacarose, glucose e frutose. Para além disso, a cevada possui outros polissacarídeos como a celulose e a hemicelulose. O primeiro representa cerca de 5% do conteúdo do cereal, encontrando-se exclusivamente na casca. Como as enzimas do malte não têm capacidade de metabolizar a celulose, este polissacarídeo não vai ter qualquer efeito na qualidade do produto final. Considerando a hemicelulose, esta corresponde a cerca de 7% da cevada, encontrando-se nas paredes celulares endospermicas, sendo composta por  $\beta$ -glucanas e arabinoxilanas. As  $\beta$ -glucanas formam micelas que, posteriormente têm que ser quebradas durante a maltagem, caso contrário podem ter um efeito negativo na viscosidade do mosto, afetando a qualidade da cerveja. As arabinoxilanas são, por sua vez, constituídas por xilose e arabinose, não tendo um impacto significativo no produto final.<sup>7</sup>

Relativamente ao conteúdo proteico da cevada, este ronda os 11%, contudo apenas um terço desse valor é que acaba na cerveja final. Devido ao estágio de ebulição e à ação de enzimas proteolíticas, as proteínas da cevada são hidrolisadas chegando à cerveja, maioritariamente, sob a forma de pequenos péptidos e aminoácidos. Estes derivados proteicos representam nutrientes essenciais para a levedura, influenciando também a turbidez e a capacidade de retenção da espuma da cerveja. A camada aleurona destaca-se neste aspeto, devido à riqueza proteica das células desta camada, muito importante a nível da produção de enzimas durante a maltagem.<sup>7</sup>

Quanto a lípidos, representam cerca de 2% do conteúdo da cevada, sendo a maior parte destes compostos ácidos gordos. Os ácidos gordos insaturados podem desempenhar um papel importante para as leveduras e para a maturação e desenvolvimento de sabores da cerveja.<sup>7</sup>

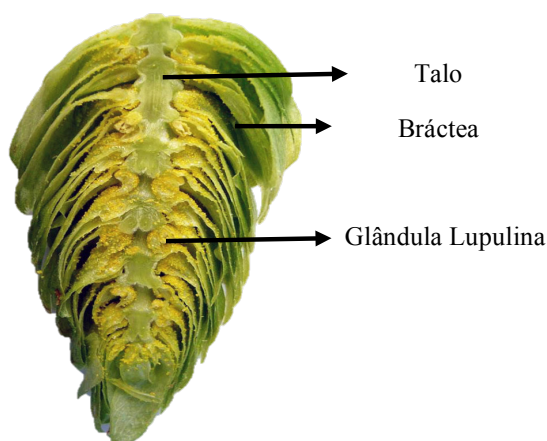
Para além disso, a cevada é também composta por matéria inorgânica, cerca de 2% do conteúdo do cereal, que inclui silicatos, fosfatos e sais. Os fosfatos e os sais, particularmente sais de Zinco, vão ser importantes durante a fermentação, enquanto que os silicatos vão influenciar a turbidez da cerveja. A cevada apresenta ainda outras substâncias na sua constituição, entre as quais: polifenóis e vitaminas.<sup>7</sup>

### **1.2.3 Lúpulo**

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma planta trepadeira originária da Europa, Ásia Ocidental e América do Norte. É uma planta perene, ou seja, apresenta uma produtividade

de 10 a 20 anos ou mais. Os órgãos reprodutores encontram-se em indivíduos distintos, o que significa que é uma planta dióica, sendo que, neste caso, o indivíduo feminino desenvolve os cones de lúpulo, a partir das flores, e são estes a serem utilizados durante o processo cervejeiro.<sup>2</sup> Por outro lado, o indivíduo masculino é utilizado apenas quando é necessário hibridizar, de forma a obter novas variedades. Esta planta pode atingir em média uma altura a rondar os 5 metros, com as raízes a poderem alcançar até cerca de 4 metros de profundidade. Habitualmente, a planta tem como suporte estacas de madeira, cimento ou até mesmo cordas.<sup>7,9</sup>

Como referido anteriormente, o cultivo comercial de lúpulo restringe-se apenas aos indivíduos femininos por fertilizar, já que estes desenvolvem os cones de lúpulo a partir das flores da planta. Os cones de lúpulo são flores femininas maduras, constituídas por pétalas de tecido mole onde as glândulas lupulinas se desenvolvem e formam aglomerados amarelados, com características aromáticas, tal como é possível observar na Figura 2.<sup>10</sup>

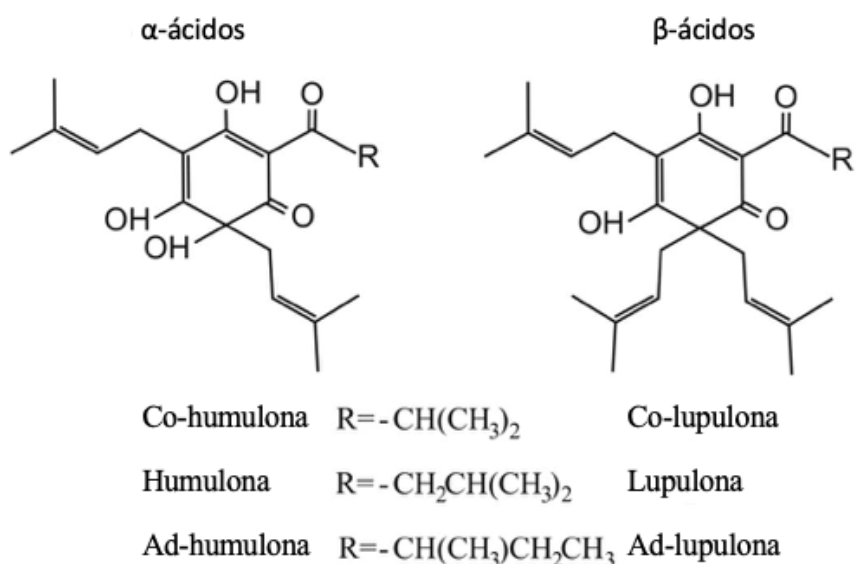


**Figura 2** – Estrutura da flor do lúpulo. Adaptado de (10).

As glândulas de lupulina são ricas em compostos responsáveis pelo amargor e aroma característicos da cerveja, mais especificamente resinas e óleos essenciais respetivamente. Para além destes, a lupulina também é constituída por outros compostos em menor quantidade, como polifenóis, que contribuem para a estabilidade química da espuma e do próprio produto.<sup>2</sup>

Tendo em conta os compostos resinosos, destacam-se os  $\alpha$ -ácidos (3-17% do peso seco dos cones), também designados por humulonas, e os  $\beta$ -ácidos (2-7% do peso seco dos cones), denominados por lupulonas. Na Figura 3, é possível identificar os principais compostos

resinosos do lúpulo.<sup>11</sup> Estes compostos contribuem para o amargor, contudo também são importantes para a estabilização da espuma da cerveja, devido às suas propriedades tensioativas. Para além disso, funcionam como conservante natural, devido às suas propriedades antibacterianas.<sup>2,11</sup> Durante o processo cervejeiro, mais especificamente na ebulição do mosto, estes compostos são sujeitos a reações de isomerização, catalisadas por elevadas temperaturas, tornando os  $\alpha$ -ácidos, previamente insolúveis, em compostos capazes de se solubilizarem no mosto. Contrariamente, os  $\beta$ -ácidos apresentam uma baixa solubilidade no mosto, mesmo após a etapa de ebulição, visto que são bastante hidrofóbicos. Desta forma, os  $\beta$ -ácidos não contribuem para o amargor da cerveja, encontrando-se em quantidades vestigiais na mesma, ao contrário dos  $\alpha$ -ácidos. No entanto, os  $\beta$ -ácidos assumem alguma importância pela sua ação antibacteriana e, conseqüentemente, ajudam na conservação do produto.<sup>2,11</sup>



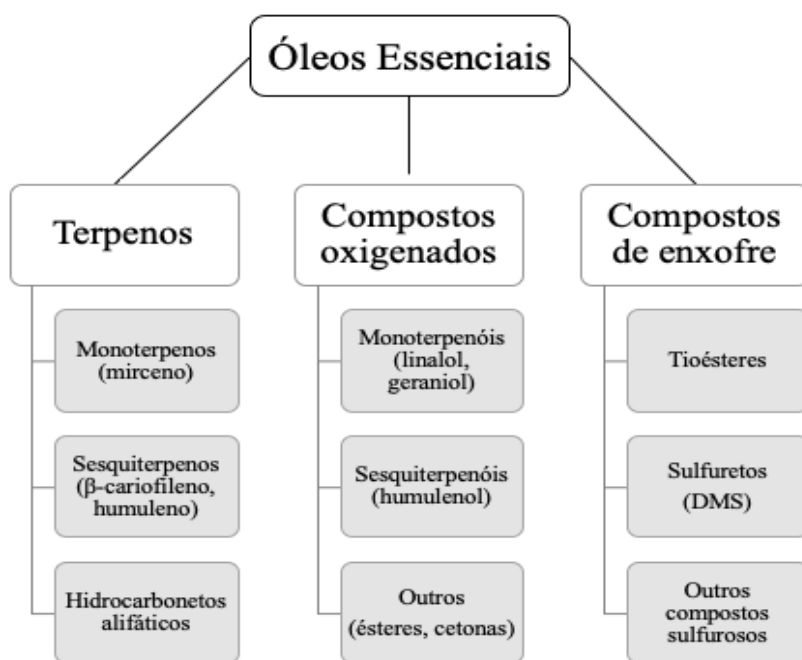
**Figura 3** – Estruturas dos principais  $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos do lúpulo. Adaptado de (11).

Relativamente aos óleos essenciais, principais contribuidores pelas características aromáticas do lúpulo, representam cerca de 4% do peso seco do cone. Os principais compostos que constituem os óleos essenciais do lúpulo são: terpenos (50-80%), compostos oxigenados (20-30%) e compostos de enxofre (<1%). Nas figuras seguintes (*Figura 4* e *Figura 5*), é possível identificar, respetivamente, os principais compostos que constituem os diferentes grupos de óleos essenciais presentes no lúpulo e respetivas estruturas químicas.<sup>2</sup>

De realçar, que os terpenos se perdem durante a etapa de ebulição do mosto, por arrastamento pelo vapor de água. Desta forma, de modo a serem perceptíveis no produto final, o lúpulo deve ser introduzido ou na fase final da ebulição (*late-hopping*) ou após a fermentação (*Dry Hopping*).<sup>11</sup> Os principais terpenos presentes nos óleos essenciais do lúpulo são: o mirceno, que é um monoterpreno, que representa cerca de 50% do total de óleos essenciais (cadeia principal constituída por 10 carbonos); o  $\beta$ -cariofileno e o humuleno que são sesquiterpenos (15 carbonos na cadeia principal). Geralmente estes compostos estão associados a aromas resinosos e herbáceos, nem sempre desejáveis.<sup>2,11</sup>

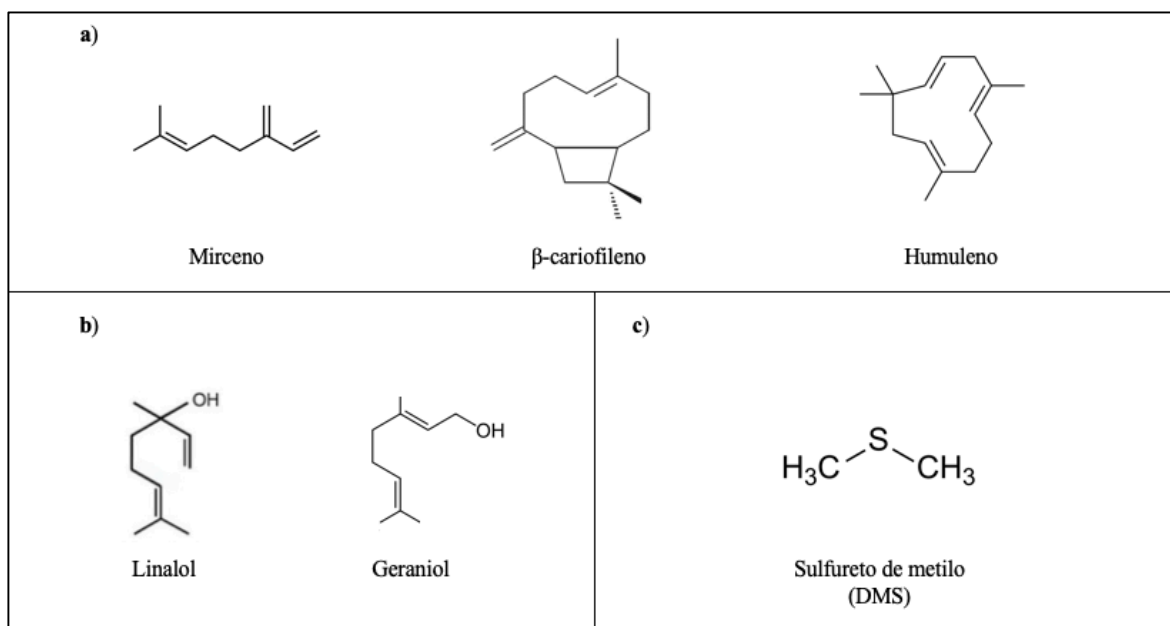
Considerando os compostos oxigenados, devido à sua maior solubilidade, a sua presença no produto final tende a ser maior. Normalmente, estes compostos, como por exemplo o linalol, conferem à cerveja aromas mais florais e frutados.<sup>11,12</sup>

Quanto aos compostos de enxofre, é pouco provável que se encontrem na cerveja devido à sua baixa concentração no lúpulo. Contudo, compostos como o sulfureto de dimetilo (DMS) devem ser evitados, já que podem dar origem a aromas indesejáveis para o produto final.<sup>11</sup>



**Figura 4** – Classificação dos principais compostos que constituem os óleos essenciais do lúpulo. Adaptado de (2).



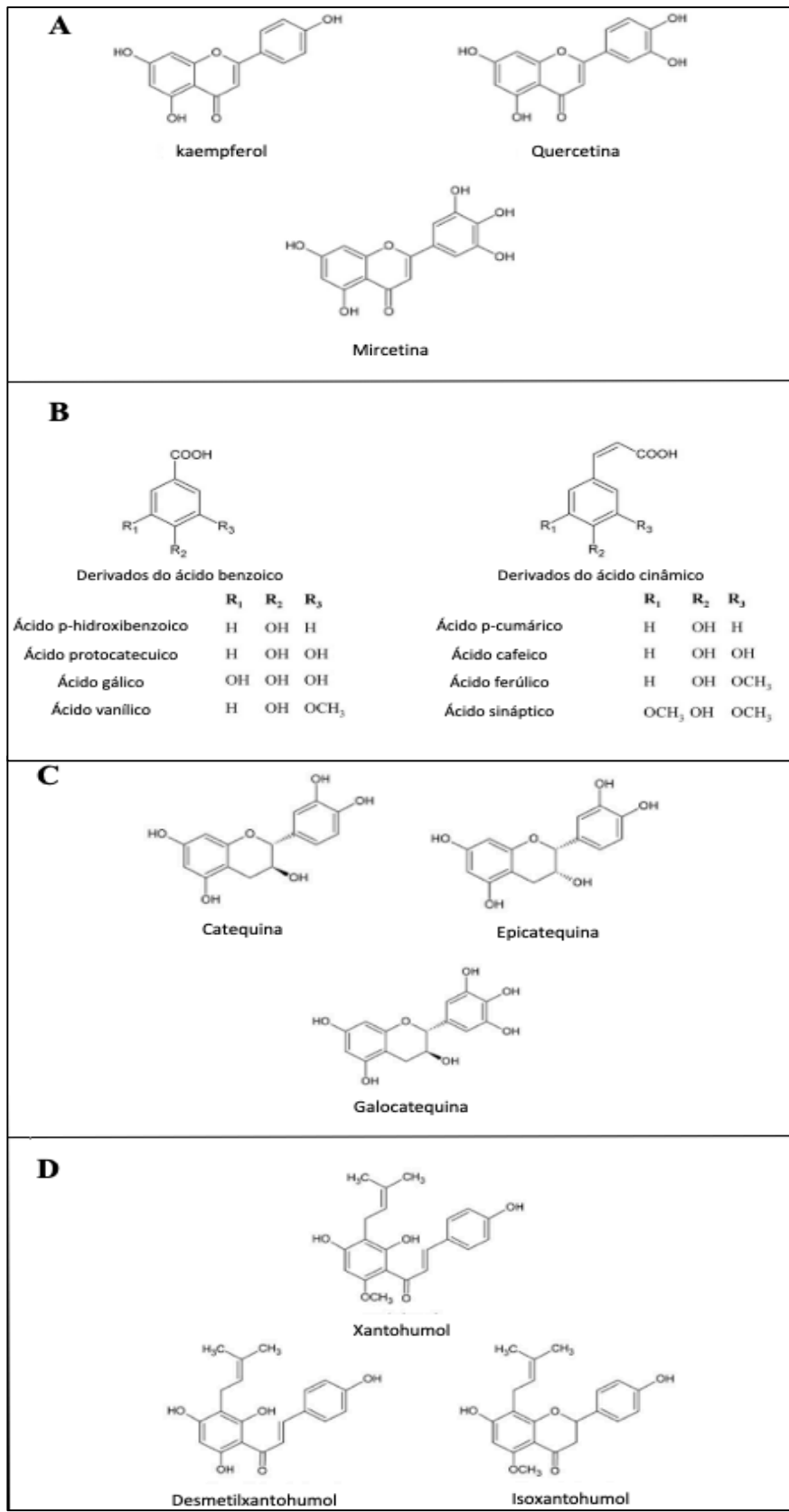


**Figura 5** – Estrutura química dos principais óleos essenciais em cada um dos grupos: (a) Terpenos, (b) Compostos oxigenados e (c) Compostos de enxofre. Adaptado de (12).

Relativamente aos compostos polifenólicos, que representam cerca de 3-6% do peso seco dos cones de lúpulo, destacam-se quatro grupos principais, nomeadamente: os flavonóis (quercetina, kaempferol e miricetina), os flavan-3-óis (catequina, epicatequina e galocatquina), os ácidos fenolcarboxílicos (gálico, sináptico, vanílico, ferúlico, entre outros) e outros compostos fenólicos, como os prenilflavonóides (xantohumol, isoxantohumol e desmetilxantohumol), que são os compostos comprovadamente benéficos para a saúde humana, devido à forte atividade biológica que demonstram. Na **Figura 6**, é possível observar as estruturas químicas dos principais polifenóis presentes no lúpulo.<sup>11</sup>

Conforme a sua finalidade, os lúpulos podem ser classificados como:

- lúpulos de amargor - ricos em  $\alpha$ -ácidos, sendo adicionados no início do processo de ebulição, sofrendo isomerização e conferindo amargor ao produto. O amargor é quantificado através da escala de IBU (*International Bittering Unit*). Alguns exemplos desta variedade são os lúpulos *Chinook* e *Magnum*<sup>2,7</sup>
- lúpulos de aroma (também designados como lúpulos de acabamento) - tal como o nome indica, são responsáveis por conferir aroma e sabor à cerveja, sendo adicionados na parte final da ebulição ou após a fermentação. Estes lúpulos são habitualmente ricos em compostos terpénicos. Variedades de lúpulo como *Cascade* e *Ella* pertencem a este grupo.<sup>2,7</sup>



**Figura 6** – Estruturas químicas dos principais polifenóis do lúpulo: (A) flavonóis, (B) ácidos fenolcarboxílicos, (C) flavan-3-óis, (D) prenilflavonóides. Adaptado de (11).

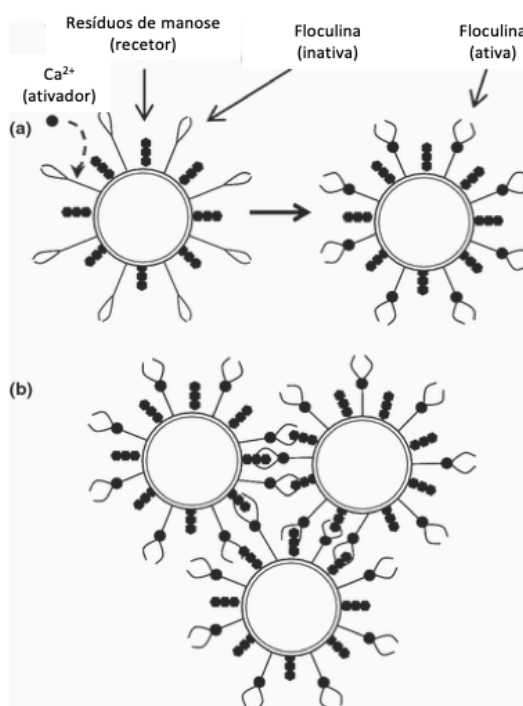
#### 1.2.4 Levedura

As leveduras pertencem ao reino dos fungos, sendo seres unicelulares anaeróbios facultativos, ou seja, podem realizar respiração aeróbia ou fermentação anaeróbia. Estes microrganismos são utilizados na indústria cervejeira para a conversão dos açúcares simples do mosto em etanol e dióxido de carbono. A reprodução das leveduras dá-se via gemulação, surgindo na superfície da levedura-mãe uma protuberância que, posteriormente, origina uma nova célula. Estas células são ovais tendo um comprimento a rondar os 10 µm e uma largura de cerca de 7 µm. Cada célula de levedura é constituída por cerca de 75% de água. Em termos de peso seco, as leveduras, em média, apresentam cerca de 55% de proteínas, 30% de hidratos de carbono, 9% de minerais (por ordem decrescente de concentração: potássio, fosfatos, sódio, cálcio, zinco e magnésio) e 6% de lípidos.<sup>2,7</sup>

As leveduras mais frequentemente utilizadas para a etapa fermentativa da cerveja pertencem ao género *Saccharomyces*, com destaque para as espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces pasturianus*, sendo a última uma espécie híbrida de *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces eubayanus*. Estas espécies podem também ter a designação de leveduras de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*) ou de baixa fermentação (*Saccharomyces pasturianus*), devido ao posicionamento que assumem no decorrer da fermentação. Enquanto que, a *Saccharomyces cerevisiae* se desloca para a superfície, a *Sacharomyces pasturianus* vai sedimentando no fundo da cuba durante a fermentação.<sup>7</sup>

Esta diferença comportamental entre estas duas espécies, deve-se à diferente capacidade de floculação das mesmas, sendo que as leveduras de baixa fermentação floculam mais facilmente, ao contrário das de alta fermentação que podem mesmo não flocular. A floculação (**Figura 7**) é um processo assexuado complexo, no qual as leveduras formam agregados/flocos constituídos por milhares de células. Este processo está associado à presença de proteínas floculinas nas paredes celulares das células das leveduras, que quando ativadas pela presença de iões de cálcio no meio estendem-se e ligam-se a resíduos de manose, presentes na parede celular de outras leveduras adjacentes. Como tal, este processo está dependente de vários fatores, entre os quais: a presença de floculinas nas paredes celulares das leveduras, a presença de iões de cálcio e a ausência de manose no meio, visto que a presença deste açúcar no meio vai impedir ou inibir a ligação das floculinas aos resíduos de manose da parede celular das leveduras.<sup>13</sup>

Tendo em conta o produto final, leveduras com maior capacidade de floculação, geralmente, originam cervejas mais claras e com menor grau de atenuação (fermentação menos completa). Por sua vez, leveduras de alta fermentação dão origem a cervejas mais turvas, mas com maior grau de atenuação (fermentação mais completa).<sup>7,13</sup>



**Figura 7** – Representação esquemática do **(a)** processo de ativação das proteínas floculinas pelos iões de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), resultando no **(b)** processo de floculação das leveduras pela interação das floculinas com os resíduos de manose na parede celular. Adaptado de (13).

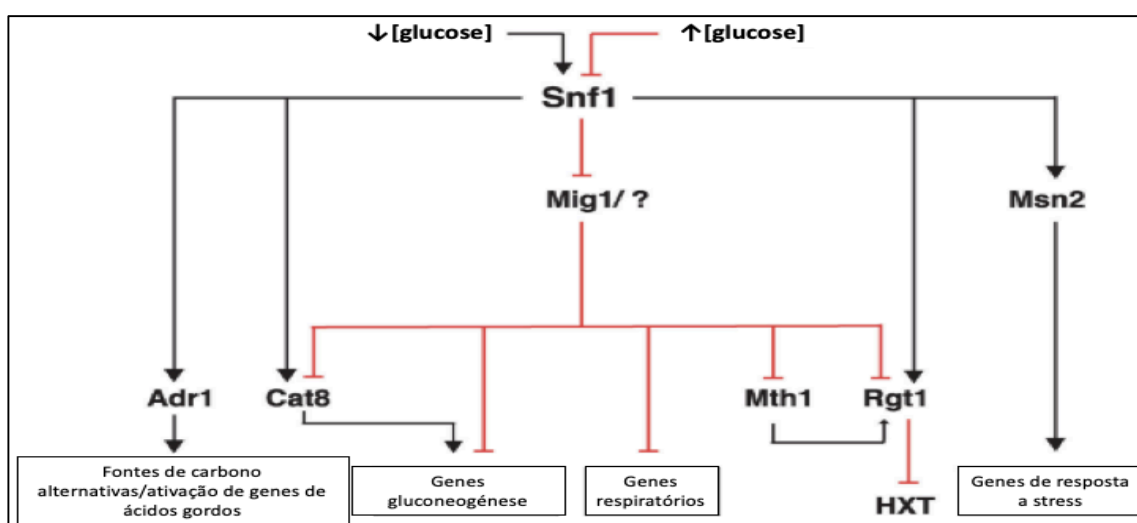
Para além da floculação estas duas estirpes diferem, igualmente, em relação à temperatura fermentativa, visto que as leveduras de baixa fermentação devem ser utilizadas em condições de temperatura a variar entre os 4 °C e os 12 °C, enquanto que as de alta fermentação devem cingir-se a temperaturas entre os 14 °C e os 25 °C. A distinção em termos de comportamento das duas espécies deu origem a uma classificação do estilo de cerveja consoante a levedura utilizada. As de alta fermentação estão associadas aos estilos *ale*, *stout* e *porter*, enquanto as leveduras de baixa fermentação estão relacionadas com o estilo *lager*.<sup>7</sup>

Tendo em conta o metabolismo das leveduras, como seres anaeróbios facultativos possuem duas vias metabólicas, mais concretamente: a respiração (condições de aerobiose)

e a fermentação alcoólica (condições anaerobiose). Comparando o rendimento energético de ambas as vias metabólicas, fermentação alcoólica e respiração aeróbia, é claro que recorrendo à segunda via metabólica o rendimento energético é muito superior. Na respiração aeróbia são obtidas 38 moléculas de ATP por cada molécula de glucose, enquanto que na fermentação alcoólica apenas 2 moléculas de ATP são produzidas.

Contudo, tendo em conta o processo cervejeiro, mesmos em condições de aerobiose, ou seja, na presença de oxigénio, e na presença de elevadas concentrações de açúcares fermentescíveis, a fermentação alcoólica é a via metabólica predominante, com os açúcares simples do mosto a serem metabolizados em etanol e CO<sub>2</sub>. Este fenómeno é designado por efeito de *Crabtree*, e ocorre devido a um mecanismo denominado por via principal de repressão por glucose.<sup>5,14</sup>

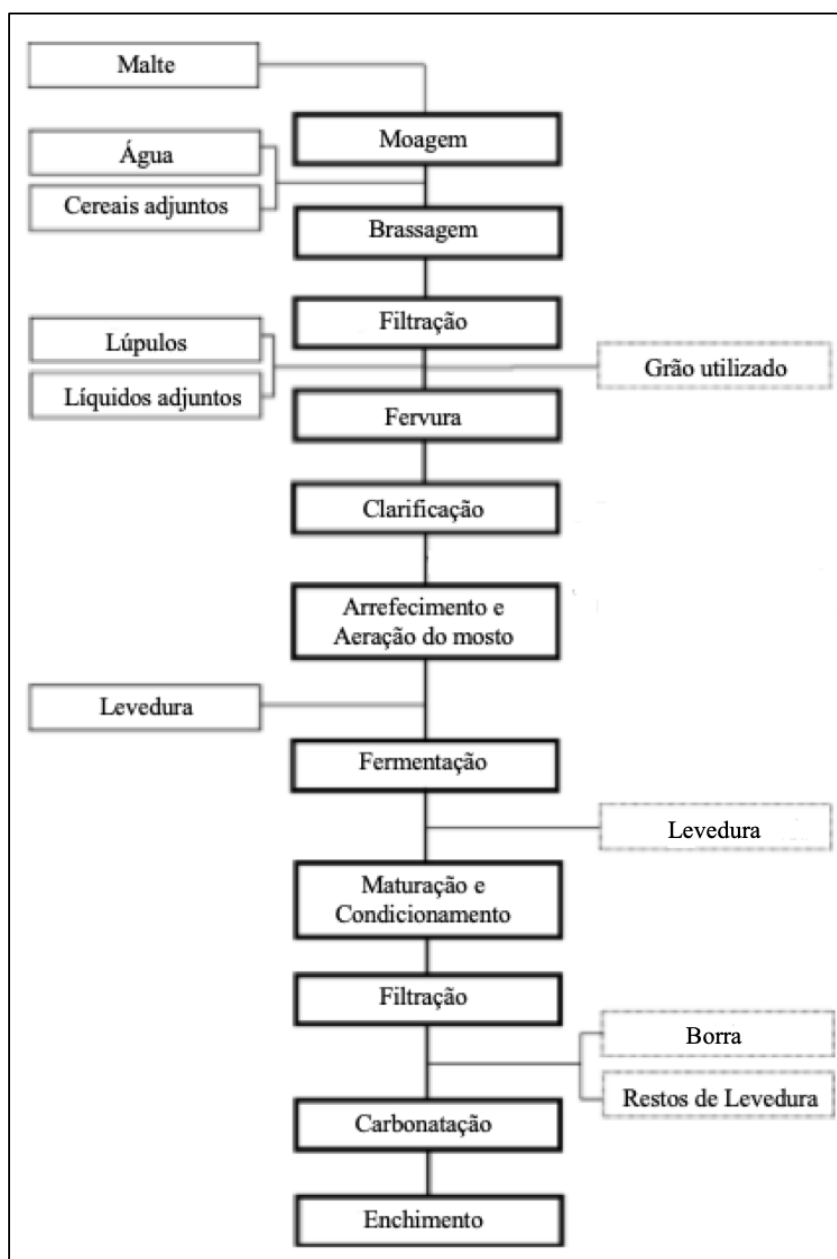
A repressão pela glucose abrange a regulação de uma série de genes e proteínas envolvidas na utilização das fontes de carbono e geração de energia, como é possível observar na Figura 8. A presença de elevadas concentrações de glucose resulta na inativação da proteína Snf1, o que por sua vez vai resultar na repressão de uma multitude de genes relacionados com a respiração e com a utilização de fontes de açúcar não fermentescíveis. Por outro lado, quando a quantidade de glucose é limitada, a proteína Snf1 assume a sua atividade, encarregando-se da fosforilação de várias proteínas, que por sua vez ativam os mecanismos necessários para a obtenção de energia a partir fontes de carbono alternativas, que não a glucose.<sup>14</sup>



**Figura 8** – Via de repressão pela glucose na levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptado de (14).

## 2 Processo cervejeiro

Tal como a cerveja, o processo de produção da mesma também não é algo padronizado, podendo variar ao nível das técnicas, etapas, ingredientes e equipamentos utilizados. No esquema seguinte, é possível observar as principais etapas realizadas para a obtenção da cerveja (Figura 9).



**Figura 9** – Representação esquemática do processo cervejeiro. À esquerda estão representados os materiais adicionados ao longo do processo. À direita representados os materiais retirados ao longo do mesmo. Adaptado de (5).

## **2.1 Moagem**

Durante a moagem dá-se a decomposição mecânica do grão de cereal maltado, de forma tornar o substrato presente no cereal, nomeadamente o endosperma amiláceo, mais acessível para as enzimas hidrolíticas do mesmo. Simultaneamente, a quebra do cereal facilita a extração e dissolução dos compostos do malte na água.<sup>5,15</sup> A moagem deve ser realizada, tendo em vista a preservação da casca do grão de cevada, já que esta irá ser importante durante a etapa de filtração do mosto. Desta forma, a realização desta etapa implica certos cuidados, visto que uma moagem insuficiente vai resultar numa baixa taxa de amido removido do grão, sendo este posteriormente descartado na subsequente filtração do mosto, influenciando, conseqüentemente, a quantidade de açúcares fermentescíveis disponíveis no mosto após o processo de brassagem. Por outro lado, uma moagem excessiva pode resultar na extração e solubilização de compostos indesejáveis para o produto final e na destruição das cascas do cereal, o que implica a perda do filtro natural que esta parte do cereal representa, dificultando bastante a posterior filtração do mosto.<sup>5</sup>

Esta etapa pode ser efetuada via diferentes técnicas, entre as quais a moagem seca, moagem húmida ou moagem condicionada. A primeira é a técnica mais comumente utilizada nas cervejeiras, consistindo na utilização de moinhos de rolos (o cereal passa entre dois rolos sendo quebrado) ou de martelos (o grão é esmagado após ser empurrado contra uma placa).<sup>5</sup>

## **2.2 Brassagem**

Durante a brassagem o malte moído é misturado com água quente durante um período normalmente a rondar as 2 horas e meia, com os parâmetros de temperatura e pH controlados. O objetivo é tornar a hidrólise, catalisada pelas enzimas ativadas durante a maltagem, dos compostos presentes no grão, nomeadamente do amido e proteínas, mais eficiente. Estas reações de hidrólise resultam em moléculas menos complexas, onde se incluem os açúcares fermentescíveis e péptidos/aminoácidos.<sup>15</sup> Através da gestão e controlo das temperaturas e duração ao longo de vários patamares durante a brassagem (rampas de temperatura), os cervejeiros são capazes de sequencialmente ativar e inativar enzimas que vão influenciar vários parâmetros da cerveja, tais como: o teor alcóolico, os açúcares fermentescíveis no mosto, concentração de nutrientes para a levedura, pH do mosto e

cerveja, o conteúdo em  $\beta$ -glucanas e algumas propriedades físicas do produto final como a espuma, cor e turbidez.<sup>5,15</sup>

As rampas de temperatura, como é possível observar na Figura 10, são determinadas tendo em conta as temperaturas ótimas das enzimas que se pretende que atuem. Primeiramente, a mistura é submetida a temperaturas a rondar os 45-50°C, permitindo a ação de enzimas proteolíticas (proteases), que irão converter o conteúdo proteico do malte em pequenos péptidos e aminoácidos, que, posteriormente, serão utilizados pelas leveduras para o crescimento e multiplicação das mesmas. Para além disso, a degradação do conteúdo proteico nesta fase também vai influenciar o sabor, cor e a espuma da cerveja. Uma proteólise muito longa vai resultar numa cerveja muito escura, com pouco corpo e com uma espuma pouco consistente.<sup>5</sup>

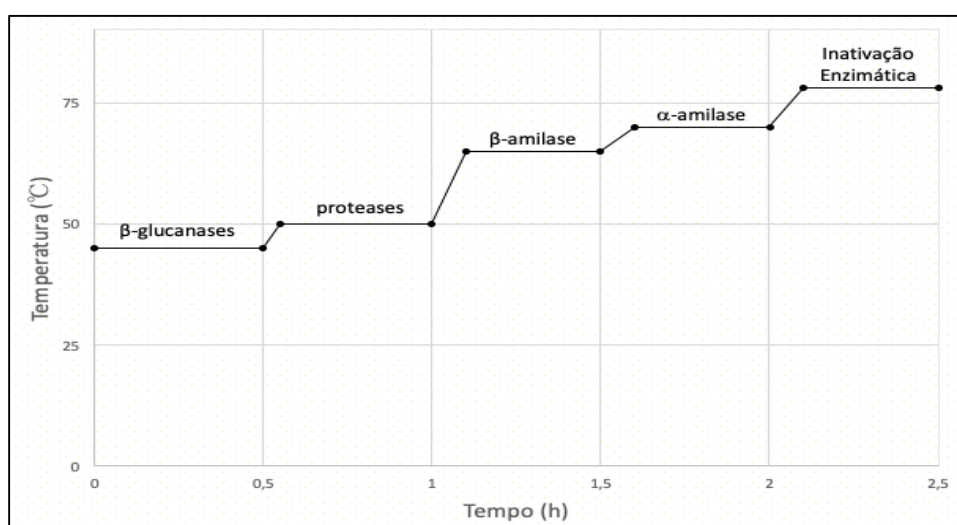
Neste intervalo de temperaturas também atuam enzimas que degradam os açúcares complexos das paredes celulares endospérmicas ( $\beta$ -glucanas e hemicelulose). Uma degradação insuficiente destes compostos pode implicar um mosto com uma viscosidade demasiado elevada, acarretando problemas em relação à posterior filtração da cerveja ou até mesmo em termos de turbidez do produto final.<sup>5</sup>

De seguida, o mosto é submetido a temperaturas mais elevadas, a rondar os 60-75°C, provocando a gelatinização dos grânulos de amido e facilitando a ação das enzimas  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilase, que vão ser responsáveis pela degradação do mesmo. Nesta fase, o amido é convertido em glucose, maltose e dextrinas pelas amilases, num processo denominado por sacarificação. A exoenzima  $\beta$ -amilase está ativa a partir do intervalo de temperaturas entre os 62-65°C, sendo responsável pela hidrólise das ligações  $\alpha$ -(1,4)-D-glicosídicas das cadeias lineares da amilose e amilopectina. A atuação desta enzima inicia-se desde a extremidade não redutora dessas cadeias, clivando de duas em duas unidades, e resultando, maioritariamente, em resíduos de maltose, que é um açúcar fermentescível. Por outro lado, a  $\alpha$ -amilase, que também atua através da hidrólise de ligações  $\alpha$ -(1,4)-D-glicosídicas, cliva de forma aleatória no interior das cadeias da amilose e amilopectina e encontra-se ativa durante o intervalo de temperatura entre os 70-75°C. A ação desta enzima vai resultar na diminuição da viscosidade do amido gelatinizado, resultando em resíduos de glucose, maltose e outros polissacarídeos que, por sua vez, já podem sofrer a ação da  $\beta$ -amilase. Complementarmente, a ação da  $\alpha$ -amilase, também vai originar dextrinas, que são açúcares não fermentescíveis, mas que irão conceder a sensação de doçura e corpo à cerveja.<sup>15</sup>



Por fim, a mistura é submetida a uma temperatura de cerca de 78°C com o objetivo de inativar toda a ação enzimática e, desta forma, preservar o conteúdo de açúcares fermentescíveis presentes no mosto, evitando igualmente o desenvolvimento de aromas e sabores a ranço, promovidos pela ação da enzima lipoxigenase.<sup>5</sup>

Habitualmente, a brassagem é realizada em cubas de aço inoxidável com aquecimento através de vapor quente, que passa por tubos soldados ao fundo e às laterais da cuba, contando também com agitação, de modo a tornar o processo mais eficiente e a mistura mais homogênea.<sup>5,15</sup>



**Figura 10** - Representação dos patamares de temperatura realizados durante o processo de brassagem, com a respetiva sequência de ativação enzimática ao longo do tempo.

### 2.3 Filtração do mosto

A filtração subsequente à brassagem, consiste na separação do mosto, com os compostos do malte dissolvidos, das substâncias não dissolvidas no mesmo, nomeadamente resíduos sólidos, como as cascas do grão. Este subproduto, correntemente designado por dreche, é normalmente aproveitado para ração animal.<sup>5</sup>

Esta etapa separativa é, na maioria dos casos, conduzida numa cuba com uma placa de filtração incorporada no fundo da mesma (*lauter tun*) ou num filtro de prensas, constituído por uma série de placas na vertical, normalmente com uma tela de polipropileno com porosidade reduzida, por onde o mosto é bombeado (*mash filters*). Comparando com os *lauter tuns*, os *mash filters* permitem obter um maior rendimento e rapidez no processo de filtração do mosto, para além de não dependerem do tipo e qualidade de cereal utilizado na

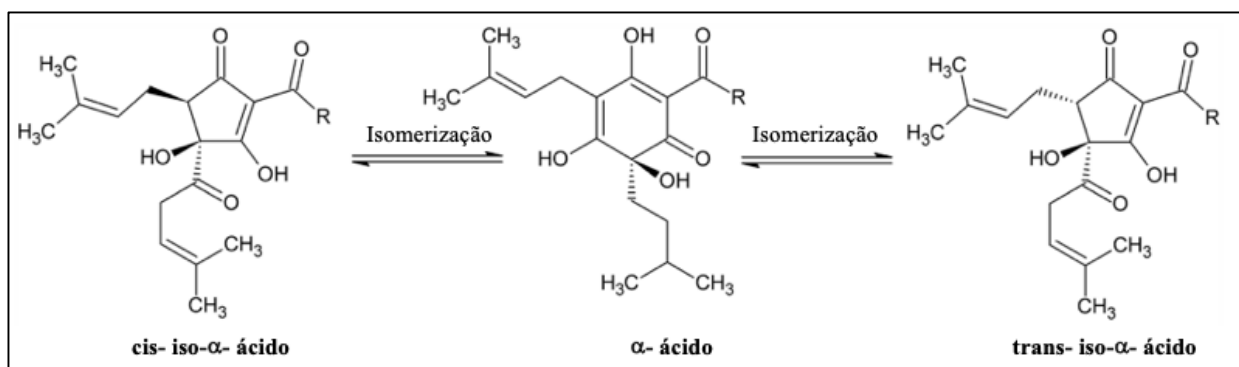
produção do mosto. Por outro lado, no caso dos *lauter tuns*, existe uma necessidade na presença das cascas de malte intactas, que assumem uma grande importância, ao funcionarem como primeiro filtro natural, influenciando decisivamente o rendimento desta etapa.<sup>2</sup>

Geralmente, esta etapa tem uma duração compreendida entre 1 a 2 horas, dando-se inicialmente a filtração do mosto, e de seguida, a lavagem dos resíduos sólidos com água quente, entre os 75-80°C, com o propósito de retirar de forma mais completa e eficiente todos os açúcares que possam ter ficado adsorvidos nos restos de grão.<sup>5,6,15</sup>

## 2.4 Ebulição

A ebulição é a etapa com maior dispêndio energético de todo o processo cervejeiro, podendo estender-se durante um período a rondar as 2 horas.<sup>5</sup> Nesta fase, o mosto é fervido vigorosamente e o lúpulo adicionado.

Os principais objetivos da ebulição incluem: **1)** a estabilização biológica do mosto, ou seja, a destruição/eliminação de microrganismos; **2)** a solubilização e transformação dos componentes presentes no lúpulo, através das reações de isomerização dos  $\alpha$ -ácidos (Figura 11)<sup>11</sup>, que resultam em iso- $\alpha$ -ácidos que conferem o amargor à cerveja, e a extração dos compostos aromáticos, apesar de apenas uma pequena fração destes se manter no mosto, já que a maior parte volatiliza com o vapor de água resultante da ebulição; **3)** a eliminação de alguns compostos voláteis indesejáveis, nomeadamente através da volatilização do Sulfureto de dimetilo (DMS) que tem origem no seu precursor S-Metil-Metionina (SMM). O DMS confere à cerveja um aroma indesejável a vegetais cozidos<sup>16</sup>; **4)** desnaturação e precipitação de proteínas de alto peso molecular, contribuindo para a formação de complexos com polifenóis, algo importante para a estabilidade coloidal do produto final, já que torna o mosto mais limpo e estável; **5)** o aumento da concentração do mosto, através da evaporação de água; e por último, **6)** a desnaturação de enzimas ainda ativas após a brassagem.<sup>5,6</sup>



**Figura 11** – Reação de isomerização dos  $\alpha$ -ácidos do lúpulo, resultando nos respetivos iso- $\alpha$ -ácidos durante a etapa de ebulição do mosto. Adaptado de (11).

Para além disso, nesta fase também ocorrem reações de Maillard que produzem compostos, nomeadamente melanoidinas, que irão afetar a cor e aroma do produto final. Estes compostos resultam de reações entre açúcares redutores e aminoácidos, que em combinação com os ácidos do lúpulo e com a precipitação de alguns compostos alcalinos vão acidificar o mosto, contribuindo para os processos de esterilização e coagulação proteica.<sup>5,6</sup>

Deste modo, tal como referido anteriormente, a ebulição vai influenciar o produto final de forma categórica e, como tal, a correta realização desta etapa é fulcral para a obtenção de um produto em conformidade com o desejado. Para tal, existem algumas medidas que garantem isso mesmo, minimizando possíveis consequências negativas da ebulição, como: a redução do tempo de aquecimento do mosto e do tempo de ebulição, redução da temperatura durante a ebulição e redução do tempo de arrefecimento após a ebulição.<sup>5</sup>

## 2.5 Clarificação, arrefecimento e aeração do mosto

Após a ebulição, os compostos insolúveis e restos de lúpulo são separados do mosto. Para tal, podem ser utilizadas diferentes técnicas, como a decantação (ação gravitacional) ou *whirlpool* (força centrípeta).<sup>5,6</sup> O *whirlpool* é uma técnica económica e com arrefecimento rápido, consistindo num reservatório cilíndrico para o qual o mosto é bombeado tangencialmente, criando um fluxo rotacional que vai levar à sedimentação dos resíduos no fundo do mesmo. Por fim, o mosto clarificado é retirado pela lateral do reservatório.<sup>5</sup>

É já no *whirlpool* que são muitas vezes adicionados os lúpulos de aroma, referidos anteriormente. O facto do arrefecimento do mosto ser mais rápido, evita a isomerização dos

$\alpha$ -ácidos presentes no lúpulo e, conseqüentemente, o acréscimo de amargura indesejável à cerveja.<sup>5</sup> Outra das vantagens do arrefecimento mais rápido do mosto, é a redução da transformação das quantidades residuais de S-Metil-Metionina, que restam após a ebulição, em Sulfureto de dimetilo (DMS), já que a manutenção do mosto a altas temperaturas por longos períodos estimula esta reação indesejável para o produto, como já foi referido.<sup>16</sup>

Posteriormente, o mosto pode passar ainda por um permutador de placas, com o intuito de baixar a temperatura do mesmo para um valor ótimo para a ação das leveduras durante a fermentação. No permutador de placas, o mosto com uma temperatura elevada passa no sentido inverso à água a baixa temperatura, resultando no decréscimo de temperatura deste. Por último, o mosto deve ser arejado com a adição de uma quantidade suficiente de oxigénio, essencial para o início da atividade da levedura, na etapa seguinte.<sup>5,15</sup>

## 2.6 Fermentação

Na fermentação, a levedura capta açúcares simples e aminoácidos presentes no mosto, utilizando-os para efeitos reprodutivos e energéticos, resultando em dois produtos maioritários: dióxido de carbono e etanol. Para além destes, o metabolismo da levedura vai também originar subprodutos que conferem ao produto final aromas, sabores e outras características desejáveis para a cerveja, como: a redução do pH, mudança de cor e composição.<sup>6,11</sup>

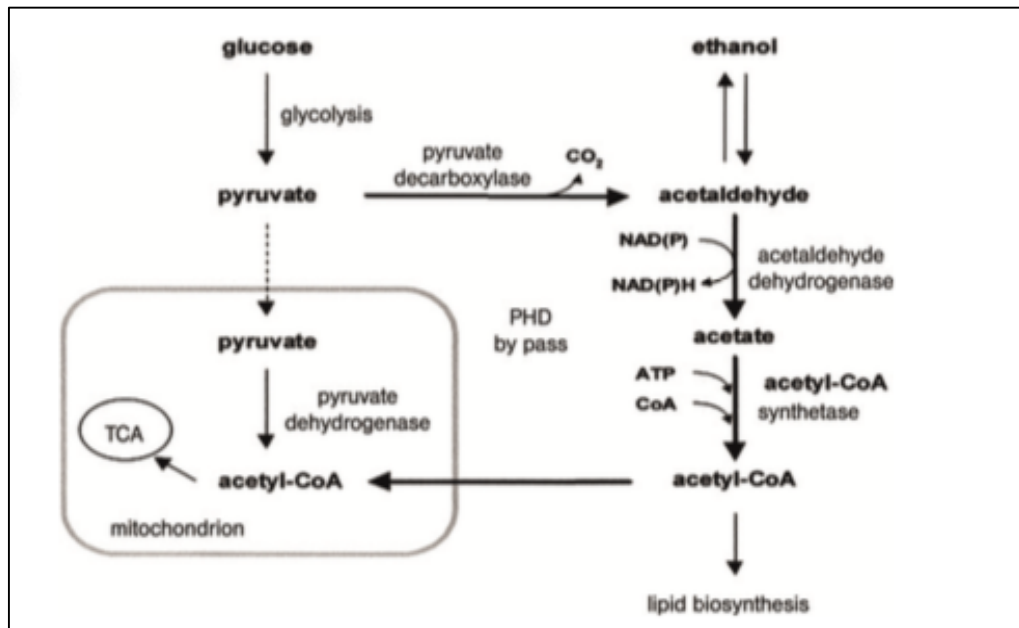
Normalmente, esta etapa dá-se numa cuba de fermentação, sendo que a escolha do tipo de fermentador e a levedura vão afetar as características do produto final.<sup>15</sup> Atualmente, os fermentadores cilindrocónicos (CCVs- *cylindroconical vessels*) em aço inoxidável são os mais usuais, e tal como o nome indica, são constituídos por um cilindro vertical fechado no topo, com uma base em forma de cone. A popularidade deste tipo de cubas fermentativas deve-se ao facto de representarem um baixo investimento e uma maior eficiência (menor desperdício de cerveja, maior volume útil do reator e limpeza otimizada através de sistema CIP (*clean in place*)). Para além disto, o facto destes reatores serem compostos por aço inoxidável (metal inerte) confere-lhes maior robustez, resistência à corrosão e facilidade no controlo da temperatura durante o processo fermentativo, já que apresentam uma boa condutividade térmica.<sup>8</sup>

Na maioria dos casos, a fermentação inicia-se através da inoculação de uma estirpe de levedura selecionada no mosto arrefecido e previamente arejado. Em alguns casos

específicos, são utilizadas várias estirpes de levedura para a realização de fermentação mista e em certas cervejas, como por exemplo nas do estilo belga *Lambic*, a fermentação ocorre de forma espontânea com uma complexa mistura de microrganismos envolvida.<sup>5,15</sup>

Durante as horas iniciais da etapa fermentativa, a aeração do mosto resulta na degradação aeróbica de hidratos de carbono presentes neste. Como é possível observar na Figura 12, este mecanismo tem início através da glicólise, seguindo-se o Ciclo de Krebs (TCA – Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos), na mitocôndria. A fermentação do mosto, em específico, inicia-se após este curto período de respiração aeróbia, que representa menos de 10% do metabolismo da levedura durante esta etapa. Apesar de bastante curto, o metabolismo aeróbio assume uma grande importância para o sucesso desta etapa, visto que permitirá às leveduras a obtenção uma quantidade energética maior, essencial para a multiplicação celular das mesmas. Para tal, é necessária a presença de uma concentração de oxigénio suficiente no mosto, através da aeração prévia do mesmo.<sup>5</sup>

Tal como é possível observar na Figura 12, a fermentação dá-se no citoplasma da levedura, tendo início através da glicólise, com a conversão de moléculas de glucose em piruvato. Esta transformação resulta da fosforilação da glucose, que pela ação da enzima hexocinase, vai dar origem a glucose-6-fosfato. De seguida, este composto irá ser isomerizado pela fosfohexose isomerase, resultando em frutose-6-fosfato, que por sua vez, irá ser fosforilada, pela enzima fosfofrutocinase, originando frutose-1,6-bifosfato. Esta molécula é, posteriormente, clivada por uma aldolase, produzindo gliceraldeído-3-fosfato e dihidroxiacetona-fosfato (DHAP). As moléculas de DHAP sofrem isomerização, resultando em mais compostos de gliceraldeído-3-fosfato. Este último é convertido a 1,3-bifosfoglicerato, pela enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. Posteriormente, o bifosfoglicerato é convertido a 3-fosfoglicerato, pela ação da enzima fosfoglicerato cinase, resultando na libertação de uma molécula de adenosina trifosfato (ATP). O fosfoglicerato é então isomerizado, pela enzima fosfoglicerato mutase, originando 2-fosfoglicerato, que por sua vez, vai ser convertido por uma enolase, em fosfoenolpiruvato. Por fim, este composto irá sofrer a ação da enzima piruvato cinase, havendo a libertação de ATP e formação de piruvato, produto final da glicólise. De seguida, a fermentação prossegue com a conversão de piruvato a acetaldeído e dióxido de carbono, por via da ação da enzima piruvato descarboxilase. Por último, o acetaldeído vai ser reduzido, pela enzima álcool desidrogenase, originando etanol.<sup>17</sup>



**Figura 12** –Representação esquemática do metabolismo da glicose na levedura. Retirado de (8).

Durante a fermentação são sintetizados outros compostos resultantes do metabolismo secundário das leveduras, nomeadamente: ésteres, álcoois superiores, diacetilo, aldeídos e compostos sulfurosos.<sup>8</sup> Estes compostos conferem à cerveja propriedades organolépticas que podem ser benéficas, mas também prejudiciais para o produto.<sup>2,5</sup>

Relativamente aos ésteres, estes compostos são formados, maioritariamente, durante a fase de crescimento da levedura, conferindo à cerveja aromas frutados desejáveis em quantidades apropriadas. O principal éster na cerveja é, tipicamente, o acetato de etilo. Quanto aos álcoois superiores, estes são subprodutos da síntese de aminoácidos das leveduras, tendo, na maioria dos casos, efeitos positivos no aroma da cerveja. Entre estes compostos salientam-se o propanol e o 2-metilbutanol.<sup>5</sup>

Por outro lado, o diacetilo, que é uma dicetona vicinal, confere à cerveja aromas amanteigados indesejáveis, representando, como tal, um *off-flavor*. Este composto também tem origem na síntese de aminoácidos por parte da levedura, sendo um subproduto da mesma. Da forma idêntica, os aldeídos, particularmente o acetaldeído, que tem origem na descarboxilação do piruvato durante a fermentação alcoólica, constituem um *off-flavor* para o produto final (aroma a maçã verde). Habitualmente, as leveduras são capazes de reduzir

estes compostos durante a fermentação e maturação, limitando assim o impacto negativo dos mesmos.<sup>5</sup>

Quanto aos compostos sulfurosos, são de salientar o sulfureto de dimetilo (DMS) e o sulfureto de hidrogénio (aroma a ovos cozidos), sendo este último libertado/excretado pelas leveduras para o mosto durante a fase de crescimento, quando não é incorporado nos aminoácidos que contêm enxofre. Os efeitos negativos deste composto, podem ser reduzidos através de um condicionamento a temperaturas superiores (10-12°C).<sup>5</sup>

## 2.7 Maturação

Após a etapa fermentativa, a cerveja imatura, também designada como “cerveja verde” (*green beer*, em inglês), é sujeita a uma etapa de maturação, na qual é se dá a manutenção do produto, durante determinado intervalo de tempo, a uma temperatura mais baixa do que na etapa fermentativa, normalmente com valores a rondar os 5-7 °C, durante um período a rondar os 10 dias. No entanto, tanto a temperatura como o tempo de maturação podem variar, dependendo do estilo e complexidade da cerveja.<sup>5,11</sup>

O processo maturativo tem como principais objetivos o refinamento e arredondamento dos sabores e aromas da cerveja e a eliminação ou redução do teor de compostos indesejáveis presentes na cerveja imatura, como por exemplo o diacetilo e o acetaldeído.<sup>11</sup>

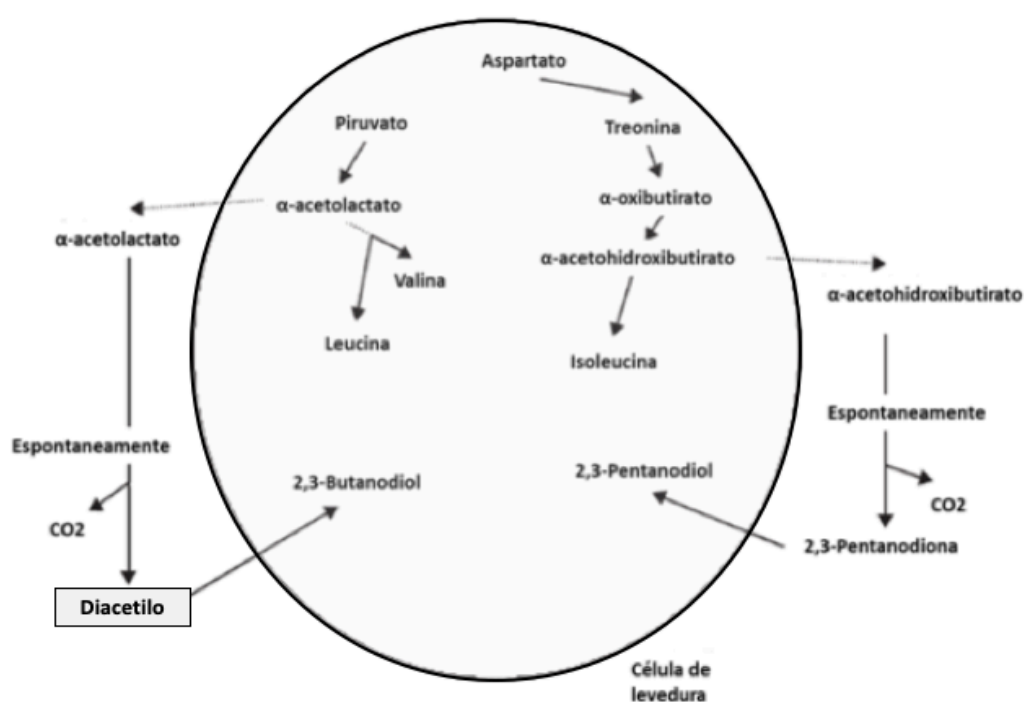
Relativamente ao diacetilo, como é possível observar na Figura 13, a sua formação está relacionada com a síntese de aminoácidos, nomeadamente valina e leucina, e a sua presença no produto final em concentrações superiores a 0,2 mg/L é indesejável. Durante a maturação a temperaturas mais baixas, as leveduras conseguem captar este composto e convertê-lo a 2,3-butanodiol recorrendo a determinadas enzimas. Desta forma, a presença deste composto no produto final é minimizada, assim como o aparecimento de eventuais *off-flavours* provenientes do mesmo. De forma semelhante, o composto 2,3-pentanodiona, que também indesejável acima de certa concentração, é captado pela levedura durante esta etapa, e como tal, os seus efeitos negativos para o produto final são limitados.<sup>2</sup>

Quanto ao acetaldeído, concentrações acima de 25 mg/L devem ser evitadas, contudo através do processo maturativo, a baixas temperaturas, o teor deste composto no produto final também é reduzido e o impacto negativo que o mesmo poderia ter para a cerveja é igualmente bastante limitado. Geralmente, durante esta etapa a concentração de acetaldeído

na cerveja é reduzida para um valor cerca de quatro vezes inferior ao valor que antecedeu a maturação, normalmente a rondar os 10 mg/L.<sup>2,18</sup>

Tendo em conta outros compostos, a presença de elevadas concentrações de ácidos gordos insaturados, nomeadamente do ácido linoleico, e a decomposição dos mesmos pode ter um impacto negativo para a cerveja, já que contribuem para o aparecimento do composto (E)-nonenal, responsável pelo sabor indesejável a cartão. O controlo destes compostos pode ser importante para definir os parâmetros da temperatura e duração da etapa.<sup>19</sup>

Esta etapa permite, igualmente, a sedimentação das leveduras e outros compostos, como proteínas, levando à diminuição da turbidez do produto final.<sup>11</sup>



**Figura 13** – Mecanismo de formação de diacetilo e reabsorção do mesmo por parte da levedura.

Adaptado de (2).

Geralmente, é já no decorrer na maturação que se dá o processo de *dry-hooping*, que tem como finalidade conferir à cerveja características aromáticas e sabores mais vincados, através de nova utilização do lúpulo. Este processo de *dry-hooping* contribui também para uma maior estabilidade coloidal, através da formação de compostos insolúveis, e da espuma, já que as resinas amargas do lúpulo possuem propriedades tensioativas.<sup>20,21</sup> Assim, os lúpulos utilizados nesta etapa pertencem essencialmente a variedades de aroma. Este método é característico de alguns estilos de cerveja, nomeadamente do estilo IPA (India Pale Ale),



marcado pelos aromas florais e cítricos bastante intensos. Pela sua especificidade o *dry-hopping* não é efetuado em todos os tipos de cerveja.

O *dry-hopping* realiza-se após a fermentação, na maioria dos casos durante a maturação, de modo a evitar as altas temperaturas realizadas nas fases iniciais do processo cervejeiro e a consequente perda de compostos voláteis por arrastamento pelo vapor. A presença de leveduras durante este processo não é necessária, no entanto pode ter alguns benefícios, já que estas são capazes de metabolizar o oxigénio que se dissolve durante a etapa, evitando desse modo a oxidação da cerveja.<sup>21</sup>

A realização deste processo de forma acertada, está dependente de algumas variáveis que podem influenciar não só o seu rendimento, como também a qualidade do produto final. A quantidade de lúpulo utilizado e a geometria do equipamento vão influenciar o modo como o processo decorre. Para além disso, outros parâmetros como a temperatura também vão ser importantes, já que a velocidade de extração dos óleos essenciais aumenta de forma diretamente proporcional à temperatura. Contudo, temperaturas mais elevadas também aumentam a probabilidade de extração de compostos indesejáveis, sendo essencial o seu controlo durante esta fase, podendo variar entre os 5°C e os 25°C, consoante o tipo de cerveja e do método de *Dry Hopping* utilizado. Da mesma forma, a duração é um fator importante, já que um tempo de contacto demasiado prolongado pode levar à extração de compostos indesejáveis ou até mesmo à “migração” dos compostos de aroma da cerveja de volta para o lúpulo, devido à hidrofobicidade destes. Por último, o teor alcoólico também afeta o rendimento desta etapa, sendo que quanto mais elevado o teor alcoólico da cerveja, maior o risco de extração de compostos indesejáveis, já que o etanol possui uma capacidade de solvatação elevada.<sup>22,23</sup>

O *Dry Hopping* pode ser efetuado via diferentes métodos, no entanto o mais comumente utilizado e o mais simples é o método Torpedo. Basicamente, consiste num tanque de recirculação, pelo qual a cerveja vinda da cuba circula, entrando em contacto com o lúpulo para a extração dos seus compostos, sendo posteriormente direcionada de volta para a cuba. O processo repete-se até serem obtidas as propriedades aromáticas desejadas.<sup>22</sup>

## **2.8 Filtração da cerveja**

Após as etapas fermentativas e de maturação, a cerveja é normalmente submetida a um processo de filtração, de modo a retirar quantidades residuais de levedura ou outras

partículas sólidas, como dextrinas, material proteico e  $\beta$ -glucanas, tendo como consequência: a diminuição da turbidez, a extensão da validade e o aumento da estabilidade do produto.<sup>2</sup>

Este processo pode ser executado recorrendo a diferentes tipos de filtros. Entre os mais comuns, encontram-se os filtros de cartucho e os filtros de terras. Nos primeiros, a cerveja passa pelos filtros, que são constituídos por poros de determinadas dimensões, (normalmente, entre 1 e 5  $\mu\text{m}$ ) ocorrendo a remoção de grande parte das partículas em suspensão. O grande problema deste tipo de filtros é dificuldade em descartar o resíduo resultante da filtração.<sup>2</sup>

Na filtração por terras, o processo é um pouco mais complexo, com um conjunto de equipamentos composto basicamente por um vaso de pressão onde estão localizadas as placas filtrantes, um tanque de preparação para o qual são doseadas as terras diatomáceas e uma bomba centrífuga que ajuda no fluxo da cerveja pelo filtro. As terras diatomáceas são fósseis de algas unicelulares (diatomáceas), que apresentam na sua constituição sílica. Estas terras são usadas como agentes filtrantes pela sua elevada porosidade e capacidade de adsorção. Apesar da grande eficácia deste tipo de filtração, são precisos alguns cuidados relativos ao manuseamento das terras, já que estas podem acarretar alguns problemas de saúde, principalmente para os operadores que realizem esta etapa.<sup>7</sup>

A eficácia desta etapa depende da técnica de filtração selecionada, mas também é influenciada pelo conteúdo do próprio produto em termos de substâncias em suspensão (proteínas e leveduras) ou dissolvidas (glucanas). A concentração elevada de algumas dessas substâncias pode levar à colmatção mais rápida dos filtros.<sup>2</sup>

## **2.9 Carbonatação**

A carbonatação é uma etapa importante para aprimorar as características da cerveja, já que contribui para a formação e estabilização da espuma, aumenta a percepção do corpo da cerveja e resulta ainda no prolongamento do prazo de validade do produto. Deste modo, a concentração de  $\text{CO}_2$  no produto final vai influenciar a qualidade do mesmo e, como tal deve ser controlada.<sup>2</sup>

A solubilidade do  $\text{CO}_2$  é afetada pela composição da cerveja, mas também pela temperatura e pressão a que esta se encontra. Segundo a Lei de Henry, a solubilidade de um

gás, neste caso CO<sub>2</sub>, num líquido, aumenta com a diminuição da temperatura e com o aumento da pressão.<sup>2</sup>

Quanto aos métodos utilizados para a carbonatação da cerveja, destacam-se o condicionamento, também designado por refermentação em garrafa, que consiste na adição de uma quantidade previamente definida de açúcares fermentescíveis à cerveja já engarrafada, com a obtenção de CO<sub>2</sub> através de uma segunda fermentação.<sup>2</sup>

Atualmente, a maior parte das cervejeiras, excetuando pequenas cervejeiras artesanais, recorrem à carbonatação mecânica do produto, que consiste na injeção de uma quantidade pré-determinada de CO<sub>2</sub>, próprio para aplicação alimentar, diretamente para a cuba que contém a cerveja ou com um auxílio de um difusor para a produção de pequenas bolhas de CO<sub>2</sub>, facilmente absorvidas pelo produto.<sup>2</sup>

## **2.10 Enchimento**

O enchimento na maioria das cervejeiras contemporâneas é realizado recorrendo a equipamentos automatizados com esse propósito, sendo que, geralmente essa maquinaria tem como base o princípio de carrossel rotativo. Basicamente, as garrafas previamente higienizadas são colocadas na enchedora, para a qual a cerveja proveniente das cubas é transferida para um reservatório de menores dimensões, presente nas próprias enchedoras. De forma a evitar a oxidação da cerveja, o ar presente nas garrafas é retirado, através de um sistema de vácuo, sendo de seguida aplicada uma contrapressão com CO<sub>2</sub> e, finalmente, iniciado o enchimento da garrafa com o produto em si. Por fim, as garrafas cheias são transferidas rapidamente para uma máquina capsuladora, onde lhes é colocada uma carga metálica. O encapsulamento do produto deve ser realizado de forma rápida, de forma a minimizar o risco de eventuais contaminações, descarboxilação e/ou oxidação do produto.<sup>2</sup>

Após o enchimento pode dar-se a pasteurização da cerveja, com o intuito de estender a validade da mesma e obter uma maior segurança e estabilidade microbiológica. Este processo, realizado a elevadas temperaturas (inferiores a 100°C), pode ter consequências negativas para o produto final, já que pode levar à perda de alguns compostos aromáticos e mudanças ao nível da cor da cerveja, devido às reações de Maillard. A não eliminação de organismos patogénicos é outro fator negativo associado à pasteurização.<sup>15</sup>

## **Capítulo II - Realização de atividades diárias na empresa**

### **1. Atividades diárias na empresa**

Durante este estágio curricular, alargados períodos do mesmo destinaram-se à realização de atividades diárias da empresa relacionadas com todo o processo cervejeiro, com a especificidade das mesmas serem efetuadas em contexto microcervejeiro.

De um modo geral, as atividades praticadas na empresa, para além do fabrico do produto em si, consistiam na rotulagem e na higienização do equipamento utilizado. Como referido anteriormente, a empresa Essência D'Alma é proprietária da marca de cerveja artesanal Vadia e, como tal, durante o estágio houve a possibilidade de participar em todo o processo respeitante à obtenção dos variados produtos, supramencionados, que a marca detém. Para além destes, a empresa produz algumas cervejas de autor e limonadas, que também puderam ser acompanhadas. É importante referir que para todos os produtos mencionados anteriormente (à exceção da limonada), a empresa recorreu a um software cervejeiro, denominado *BeerSmith*. Este software garante uma melhor previsão e controlo das características do produto final, sendo que as vantagens na utilização do mesmo serão enumeradas adiante de forma mais pormenorizada.

Neste capítulo, serão abordadas algumas das atividades realizadas na empresa, nas quais houve a oportunidade de colaborar. Entre essas práticas, encontram-se processos referidos no capítulo anterior, como: *Dry Hopping*, filtração, carbonatação e higienização dos equipamentos. Para além destas, também serão descritas atividades relativas ao controlo do processo cervejeiro, através da análise dos parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba e a medição da viabilidade e concentração celular das leveduras recuperadas.

#### **1.1 Procedimentos**

Neste ponto, serão descritos os principais procedimentos realizados na empresa durante este estágio, com foco nos processos de *Dry Hopping*, filtração e carbonatação da cerveja, bem como nas atividades de higienização dos equipamentos e controlo do processo cervejeiro, que incluíam a análise dos parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba e a medição da viabilidade e concentração celular das leveduras recuperadas.

### 1.1.1 *Dry Hopping*

Devido à sua especificidade, na empresa o processo de *Dry Hopping* apenas foi realizado em algumas cervejas, nomeadamente do estilo *India Pale Ale (IPA)* e *Brut IPA*, sendo a última referente ao produto desenvolvido neste estágio.

O equipamento para a realização desta etapa incluiu uma coluna de recirculação, onde foi inserida a quantidade necessária de lúpulo, e uma bomba que assegurava a passagem contínua da cerveja entre a coluna e a cuba de origem. Na Figura 14, é possível observar o equipamento utilizado para a realização deste processo.



**Figura 14** – Sistema utilizado durante o processo de *Dry Hopping*.

O processo de *Dry Hopping*, habitualmente, é realizado após o processo de fermentação, muitas vezes durante a maturação da cerveja, antecedendo a fase de filtração. O início deste processo deu-se através da pesagem do lúpulo, com a quantidade e qualidade a variar consoante o tipo de cerveja a produzir. Após a pesagem, o lúpulo foi colocado em sacos porosos, sendo estes fechados e dispostos no interior da coluna de recirculação. De seguida, deu-se a conexão entre a cuba, que possuía a cerveja maturada, e a coluna de recirculação,

com a cerveja a entrar pela parte inferior da mesma. Após o enchimento da coluna de recirculação com cerveja, esta saiu pela parte superior da mesma, em direção a uma bomba que encaminhou a cerveja de volta para a cuba de maturação. Este trajeto do produto da parte inferior até ao topo da coluna de recirculação, permitia uma extensão do tempo de contacto com o lúpulo, devido ao maior tempo de residência da cerveja no interior da coluna, proporcionando assim uma transferência mais eficiente dos compostos do lúpulo para a cerveja.

### **1.1.2 Filtração**

No decorrer do estágio na empresa, o processo de filtração da cerveja foi realizado através de dois métodos distintos, via filtros de cartucho ou por filtro de terras. Antes de se dar início a esta etapa foi necessário garantir dois pressupostos: a existência de uma cuba livre, previamente higienizada, de forma a evitar uma potencial contaminação do produto, e a existência de um diferencial de pressão (a rondar os 2 bares) entre a cuba de origem e a cuba recetora do produto filtrado, de modo a garantir o fluxo do produto desde a primeira até à segunda cuba. De forma a controlar o processo de filtração, recorreu-se à medição da turbidez das cervejas antes e após a conclusão do processo, recorrendo-se a um turbidímetro (2100Q da marca HACH). Este equipamento indica a concentração de partículas em suspensão na amostra, através da medição da dispersão da luz incidente pela amostra quando se faz incidir um feixe de luz na mesma. Os valores foram obtidos em unidades FTU (Unidades de Formazina de Turbidez), estando estes relacionados com as unidades EBC (do inglês *European Brewery Convention*) através da seguinte razão:  $1 \text{ FTU} = 0,25 \text{ EBC}$ .<sup>24</sup>

#### Filtração por cartuchos

No caso da filtração por cartuchos, o sistema de filtração (Figura 15) foi montado entre as duas cubas com a utilização de filtros com poros de diferentes dimensões, que variavam entre os 5  $\mu\text{m}$  e 1  $\mu\text{m}$ . Habitualmente, o sistema era montado com os filtros de maior porosidade conectados à cuba de origem e os de menor dimensão à cuba de receção. Após a conclusão da montagem do sistema deu-se a abertura sequencial da válvula da cuba de origem e da válvula da cuba recetora. As duas válvulas foram abertas lentamente, com o intuito de evitar que um fluxo demasiado elevado de cerveja resultasse numa rápida

colmatação dos filtros durante a etapa. Durante a filtração, de forma a manter o diferencial de pressão necessário para o fluxo da cerveja, deu-se a injeção de Freshline (mistura de CO<sub>2</sub> e N<sub>2</sub>) na cuba de origem e a abertura do escape de gases na cuba recetora. De forma a detetar se a filtração decorria de forma normal (sem a colmatação dos filtros) recorreu-se à visualização dos níveis de cerveja de ambas as cubas. A não variação dos níveis das cubas durante um período a rondar os 10 minutos, significava que os filtros tinham colmatado e, como tal, as válvulas das cubas seriam fechadas, o sistema de filtração desmontado e os filtros higienizados.

Para a lavagem dos filtros utilizou-se o produto MIDA FOAM 193 da Christeyns, seguindo-se o enxaguamento com água corrente, no sentido contrário ao fluxo da cerveja, e consoante o seu estado, os filtros seriam reaproveitados, no caso de permitirem a passagem de água, ou descartados, caso o fluxo fosse nulo.

Posteriormente, procedia-se a uma nova montagem do sistema de filtração, concluindo-se esta etapa até ao esgotamento de cerveja na cuba de origem.



**Figura 15** - Sistema de filtração por cartuchos utilizado na empresa.

### Filtração por terras

Relativamente à filtração por terras, na Figura 16, é possível observar o equipamento utilizado para a realização deste processo.<sup>25</sup> Para se dar início à filtração, o equipamento foi inicialmente cheio com água. De seguida, no reservatório (A), foram depositadas as pré-camadas de terras diatomáceas, que variavam consoante o tipo de cerveja. Posto isto, deu-se

a conexão entre o filtro de terras e a cuba de origem (com a cerveja por filtrar), com a água inicialmente utilizada para preparação e introdução das terras no equipamento, a ser empurrada e misturada com a cerveja por filtrar, retornando à cuba de origem.

A seguir, deu-se a conexão da válvula de saída do filtro de terras com a cuba destino, para onde iria a cerveja filtrada, dando-se início ao processo de filtração em si, com a introdução de mais terras, à medida que ia sendo necessário no decorrer do processo.

A duração da filtração dependia do tipo e quantidade de cerveja a filtrar, assim como da quantidade de terras utilizadas.



**Figura 16** – Equipamento utilizado para a filtração por terras. (A) reservatório destinado à deposição das terras. (B) filtro de terras.

Adaptado de (25).

### 1.1.3 Carbonatação

Tal como é possível observar na Figura 17, durante o estágio curricular todas as bebidas, com a exceção de parte do produto desenvolvido no estágio, foram carbonatadas recorrendo-se ao método de carbonatação mecânica, isto é, através da injeção de CO<sub>2</sub> inerte, próprio para aplicação no setor alimentar.

De forma a garantir uma maior eficiência para a dissolução do CO<sub>2</sub> nos produtos, e tendo em conta a Lei de Henry, que indica que a solubilidade de um gás em líquidos aumenta de forma inversamente proporcional ao valor da temperatura, definiu-se a mesma para um valor



mais baixo (a rondar 1-3 °C) nas cubas que continham produtos destinados ao processo de carbonatação. De seguida, iniciou-se a injeção de CO<sub>2</sub> diretamente para a cuba até se atingir uma pressão a rondar 1 bar, de forma a facilitar a solubilização do gás na bebida, visto que considerando, novamente, a Lei de Henry, quanto maior a pressão mais eficiente a transferência de um gás, neste caso CO<sub>2</sub>, para meio líquido.

Após reunidas as condições anteriores, deu-se a montagem do sistema de carbonatação (Figura 17), com o produto a abandonar a cuba por ação da gravidade, passando por uma bomba que auxiliava no trajeto da cerveja de volta à cuba de origem. Numa das entradas da bomba deu-se a injeção de CO<sub>2</sub> que, deste modo, entrava em contacto com o produto, na forma de pequenas bolhas, durante a sua recirculação pelo sistema de carbonatação.



**Figura 17** – Sistema utilizado para a carbonatação dos produtos

#### 1.1.4 Higienização dos equipamentos

A fase de higienização, apesar de não pertencer ao fabrico de cerveja propriamente dito, é fulcral ao assegurar que todas as etapas do processo cervejeiro ocorrem sem contratempos, garantindo que todos os equipamentos e materiais utilizados ao longo deste se encontram livres de quaisquer contaminações que possam pôr em risco a qualidade do produto e a segurança microbiológica do mesmo.

No decorrer deste estágio, todos os equipamentos, incluindo: painéis de brassagem, filtração, *Whirlpool*, cubas de fermentação/maturação, permutadores de placas, bombas e enchedoras de barris e garrafas, foram sujeitos a um protocolo de higienização com a designação de CIP (do inglês *clean in place*) que consiste na limpeza das superfícies internas dos equipamentos sem a necessidade de desmontagem dos mesmos. Este processo tem como principais vantagens a redução do tempo de limpeza e da mão de obra necessária para a realização do mesmo; menor dispêndio energético e o uso mais eficiente de detergentes, água e desinfetantes, visto que ocorre a recirculação dos mesmos num circuito fechado.

A execução do protocolo de CIP seguiu algumas etapas gerais, consistindo primeiramente na montagem de um sistema de recirculação, possível de observar na Figura 18, através da conexão do equipamento a ser higienizado e de uma bomba que permitia o fluxo dos produtos de limpeza e desinfecção. De seguida, procedeu-se ao enxaguamento inicial dos equipamentos com água a temperaturas elevada, a rondar os 90°C, para a remoção de parte da sujidade. De seguida, deu-se a recirculação do produto alcalino MIDA FLOW 110 da Christeyns com uma diluição de 2:50 com água a rondar os 60°C, com o intuito de remover resíduos orgânicos e parte da sujidade. Após a recirculação do detergente durante cerca de 30 minutos, este foi removido através do enxaguamento de água a temperatura ambiente. Posteriormente, o sistema foi desinfetado durante 30 minutos com o produto MIDA CHRIOX5 da Christeyns, que correspondia a uma solução aquosa ácida de peróxido de hidrogénio, ácido peracético e ácido acético a 2%, diluído de 1:50 com água à temperatura ambiente, para remoção da carga microbiana. Por fim, realizou-se outro enxaguamento com água à temperatura ambiente de forma assegurar a remoção total do desinfetante utilizado.

Relativamente à higienização dos barris de inox, esta era realizada de forma automática por uma máquina, contudo os produtos de limpeza e desinfecção utilizados foram exatamente os mesmos supramencionados e nas mesmas condições. Para a desinfecção dos restantes

acessórios utilizados ao longo do processo, como cabeçotes, balanças, tampas e material de laboratório, foi utilizado o produto à base de álcool MIDA SAN 311.



**Figura 18** - Sistema de recirculação dos produtos de limpeza e desinfecção na cuba.

### **1.1.5 Análise dos parâmetros físico-químicos das cervejas em cuba**

A monitorização das cervejas durante a sua produção foi realizada desde o momento da inoculação das leveduras, estendendo-se até ao final da fermentação. Para tal, durante esse período, os produtos em cuba foram sujeitos a uma série de medições nas quais os parâmetros físico-químicos, como pH, potencial alcoólico e teor de sólidos solúveis foram analisados.

Relativamente à determinação do pH, a sua medição foi efetuada por potenciometria, através de um elétrodo de pH digital edge® (HI10480 da marca Hanna Instruments) com sensor de temperatura incorporado. Para cada medição, elétrodo de pH, previamente calibrado recorrendo a soluções tampão com valores de pH distintos, foi mergulhado completamente na amostra a analisar até à sua junção. Posteriormente, aguardou-se cerca de 1 minuto até à estabilização do valor de pH, repetindo-se este processo até serem obtidas duas medições iguais consecutivas para a mesma amostra. Por fim, entre cada medição de

diferentes amostras ou no final de todas as medições, o eletrodo foi higienizado, sendo enxaguado com água em abundância.

De forma a obter uma estimativa da quantidade de açúcares ainda presentes nos produtos ao longo do seu fabrico, utilizou-se um refratómetro digital portátil (HI96813 da marca Hanna Instruments) que permitiu a determinação do teor de sólidos solúveis totais (em °Brix). Para cada análise, com o auxílio de uma pipeta de plástico, 3 gotas de amostra foram transferidas para o compartimento do aparelho destinado à mesma, sendo que de seguida se premiu o botão “ready” para a realização de cada medição. De modo complementar, o refratómetro tinha também capacidade de estimar o potencial alcoólico (em %vol/vol) de cada produto, tendo em conta a quantidade de açúcares presentes no mesmo. Para tal, após a medição do °Brix premiu-se o botão “range”, que permitiu a obtenção do teor alcoólico provável do produto final. À semelhança das medições de pH, estas análises repetiram-se até à obtenção de dois valores de °Brix e potencial alcoólico iguais e consecutivos em cada amostra.

É importante referir que os equipamentos utilizados para a realização destas medições apresentam uma precisão associada, sendo que o refratómetro apresenta uma precisão de  $\pm 0,2\%$  e o medidor de pH de  $\pm 0,01$ .<sup>26</sup>

O registo dos valores de potencial alcoólico foi importante como indicativo da extensão da fase fermentativa, através da determinação da percentagem de atenuação dos produtos ao longo desta mesma etapa. Este parâmetro foi calculado de acordo com a Equação 1, na qual o *Potencial Alcoólico 1* corresponde ao valor obtido no dia da inoculação das leveduras no mosto, para o início da fermentação; *Potencial Alcoólico dia x* corresponde ao potencial alcoólico medido em determinado dia durante a fermentação e o *Potencial Alcoólico limite* que diz respeito ao valor mais baixo expectável para o tipo de cerveja correspondente, obtido através de testes realizados pela empresa para a maioria das cervejas, deixando o mosto das respetivas cervejas em garrafa, a 20°C, a fermentar com excesso de levedura até estar finalizada a fermentação.

$$\text{Atenuação (\%)} = \frac{\text{Potencial Alcoólico dia 1} - \text{Potencial Alcoólico dia } x}{\text{Potencial Alcoólico dia 1} - \text{Potencial Alcoólico limite}}$$

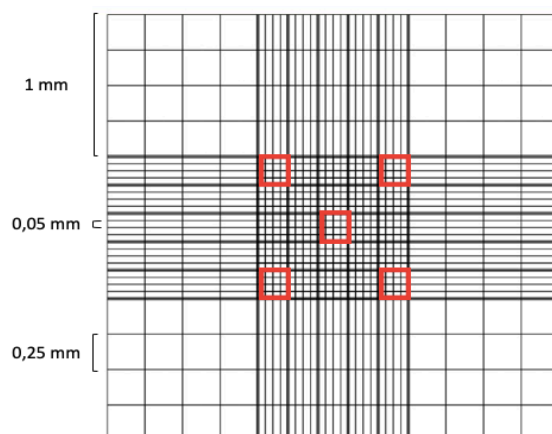
**Equação 1**

### **1.1.6 Determinação da viabilidade e concentração celular das leveduras**

A recuperação e reutilização de leveduras após cada fermentação é um dos aspetos mais importantes na gestão de leveduras da cervejaria. Contudo, o reaproveitamento destes microrganismos não é infinito, já que as sucessivas inoculações conduzem à deterioração gradual da levedura e, conseqüentemente, têm um impacto decisivo no processo fermentativo e na qualidade do produto final.<sup>27</sup> Como tal, de forma a assegurar uma fermentação adequada, as leveduras recuperadas e armazenadas foram testadas antes de nova inoculação, através da determinação da sua viabilidade e concentração celular.

Na empresa, para a realização das análises mencionadas anteriormente recorreu-se a um microscópio ótico (OMEGON), a uma câmara de Neubauer (ZUZI) e ao corante vital azul de metileno 1,5% (SIGMA-ALDRICH). Este último foi essencial para a determinação da viabilidade celular, já que permitiu diferenciar através da coloração, as células vivas das mortas, visto que as apenas as últimas apresentam coloração azul quando imersas no corante. As células viáveis, por sua vez, são capazes de reduzir o azul de metileno devido à ação de determinadas enzimas e, como tal, permanecem incolores ao serem visualizadas no microscópio ótico. De realçar, que estes métodos são utilizados para obter uma estimativa dos valores de viabilidade e concentração celular, visto que algumas células viáveis apresentam as enzimas responsáveis pela redução do azul de metileno desnaturadas ou inativas, enquanto algumas células mortas podem ainda apresentar alguma atividade enzimática tornando-se incolores. Deste modo, torna-se impossível a obtenção de resultados absolutos.

Inicialmente, uma amostra de levedura, recuperada diretamente da cuba ou armazenada em recipientes, foi recolhida e diluída (geralmente 1:100) com água num erlenmeyer. A seguir, foram adicionadas 4 a 5 gotas do corante azul de metileno, com a posterior agitação até à obtenção de uma solução homogeneizada. Posteriormente, pipetou-se uma alíquota da solução para a câmara de contagem de Neubauer e colocou-se uma lamela sobre a mesma. Por fim, observou-se a preparação no microscópio ótico, iniciando-se a contagem de células como demonstrado na Figura 19.



**Figura 19** - Representação esquemática de uma câmara de contagem Neubauer, com as zonas de contagem de células ao microscópio óptico salientadas a vermelho.

Após a contagem das células foram realizados os cálculos para determinar a viabilidade celular (% de células viáveis) (Equação 2) e concentração das leveduras nas amostras (nº de células vivas/ L de suspensão) (Equação 3). Para tal, era necessário ter-se em conta o fator de diluição ( $fd$ ) aplicado à suspensão de leveduras original e o volume acima de cada zona de contagem (quadrados assinalados a vermelho na Figura 19). Assumindo que a altura entre a zona de contagem, onde se encontrava a amostra, e a lamela era igual a 0,10 mm, foi possível calcular o volume da zona de contagem ( $V_{zc}$ ), que incluía os 5 quadrados assinalados a vermelho ( $5 \times (0,250 \times 0,250 \times 0,100) = 3,15 \times 10^{-2} \text{ mm}^3$ ).

$$\text{Viabilidade Celular (\% células vivas)} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{n^{\circ} \text{ células totais}} \times 100$$

**Equação 2**

$$\text{Concentração suspensão original (n}^{\circ} \text{ células vivas/L)} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas}}{V_{zc}(\text{mm}^3) \times 10^{-6}} \times fd$$

**Equação 3**

## 1.2 Resultados e discussão

Neste ponto serão apresentados e interpretados os resultados relativos aos procedimentos descritos no ponto anterior.

### 1.2.1 *Dry Hopping*

A forma mais rigorosa e eficaz de controlar o processo de *Dry Hopping*, seria através da realização de análises à composição volátil da cerveja. No entanto, não foi possível efetivar tais medições no decorrer deste estágio, devido à inexistência de equipamentos adequados para tal na empresa. Desta forma, na empresa, o controlo desta etapa baseou-se na realização de provas a amostras que iam sendo retiradas da cuba, por uma torneira de prova, ao longo do processo.

Apesar da monitorização desta forma ser muito pouco rigorosa, já que depende da opinião de um número limitado e reduzido de provadores (geralmente três), normalmente, as bebidas apresentavam as características organoléticas pretendidas, 4 a 5 horas após o início do processo.

### 1.2.2 Filtração

Como referido no ponto anterior dos procedimentos, a filtração foi monitorizada através da medição da turbidez de amostras retiradas da cuba antes e após a conclusão desta etapa. Na *Tabela 1*, é possível observar os valores de turbidez, em FTU (Unidades de Formazina de Turbidez), de amostras recolhidas previa e posteriormente à realização da filtração dos produtos, nomeadamente das cervejas Nautika, Rubi, Extra, IPA e Brut IPA.

Tendo em conta os valores apresentados na tabela, é notória a diminuição da turbidez em todos os produtos, no entanto, nas cervejas Vadia Nautika e Vadia Extra, os valores de turbidez continuaram elevados mesmo após o processo de filtração, e com uma redução menos acentuada, o que pode ser justificado pela utilização de filtros de cartuchos, contrariamente ao que aconteceu nos restantes produtos, que foram filtrados recorrendo ao filtro de terras.

De realçar também, que as cervejas que apresentaram menores valores de turbidez, Vadia Brut IPA e Vadia IPA, são cervejas de alta fermentação, isto é, pertencentes ao estilo *ale*. Contrariamente, as cervejas *lager* (Vadia Nautika, Vadia Rubi e Vadia Extra) apresentaram

valores mais altos após a filtração. Esta diferença nos valores de turbidez finais pode indicar que, porventura, o processo de filtração seja afetado pelo tipo de levedura utilizado, visto que leveduras *lager* apresentam uma maior capacidade de floculação, o que pode ser prejudicial para o processo de filtração, podendo resultar numa colmatação mais rápida dos filtros e, conseqüentemente, a resultados finais menos desejáveis.

Por outro lado, é igualmente importante referir que para a produção do mosto das cervejas Vadia Nautika e Vadia Extra, a quantidade de cereal utilizado foi significativamente maior do que nas restantes cervejas apresentadas na tabela seguinte, e, por conseguinte, a quantidade de nutrientes presentes no mosto destas cervejas também foi consideravelmente superior. Assim, a concentração de compostos que influenciam a turbidez do produto final, como compostos proteicos e  $\beta$ -glucanas, deverá ter sido maior nestas cervejas, implicando valores de turbidez maiores após a filtração das mesmas. Estes elevados valores de turbidez podem dever-se à insuficiente ação das proteases e  $\beta$ -glucanases durante a brassagem ou a um curto período maturativo, não permitindo a sedimentação dos compostos de alto peso molecular.

Tabela 1 – Resultados das medições da turbidez, em FTU, obtidos antes e depois do processo de filtração das cervejas., com  $T_i$  a corresponder à turbidez inicial e  $T_f$  à turbidez final dos produtos.

<b>Origem</b>	<b><math>T_i</math> (FTU)</b>	<b><math>T_f</math> (FTU)</b>
Nautika (B148)	379,0	310,0
Rubi (B145)	125,0	35,70
Extra (B146)	442,0	265,0
Brut IPA (B131)	199,6	6,950
IPA (B137)	169,0	20,60

### 1.2.3 Carbonatação

Tendo em consideração a falta de equipamento necessário para medir a concentração de  $CO_2$  dissolvido, o controlo deste processo baseava-se na recolha e prova de amostras dos



produtos em cuba ao longo do mesmo, utilizando uma torneira de prova. Tal como no processo de *Dry Hopping*, esta monitorização dependia da opinião de um número limitado de provadores, o que significava um controlo pouco exato desta etapa.

Normalmente, as bebidas apresentavam uma carbonatação satisfatória três a cinco horas depois do início da injeção de CO<sub>2</sub> na cuba, com a pressão final na mesma a rondar 1,5 bares.

#### **1.2.4 Análise dos parâmetros físico-químicos das cervejas em cuba**

No decorrer da fermentação, os produtos em cuba foram sujeitos a um conjunto de análises onde estavam incluídas medições de pH, teor de sólidos solúveis (°Brix) e potencial alcoólico (%vol/vol). Nas tabelas seguintes (*Tabela 2 e Tabela 3*), encontram-se os resultados das análises realizadas, bem como a variação da percentagem de atenuação, obtida a partir da Equação 1, de duas cervejas distintas produzidas pela empresa em Janeiro de 2020, respetivamente Vadia Trigo e Vadia Rubi.

Tendo em conta os dados da *Tabela 2*, relativos à cerveja *ale*, Vadia Trigo, percebe-se que os valores de teor de sólidos solúveis e potencial alcoólico foram diminuindo, como era expectável. Em relação ao teor de sólidos solúveis, observou-se uma redução nos valores, em °Brix, já que os açúcares presentes no mosto foram sendo consumidos e convertidos pelas leveduras. Tendo em conta o potencial alcoólico, tal como esperado, foi diminuindo ao longo da fermentação, pois à medida que a fermentação prosseguiu e o substrato se foi esgotando, o potencial para a formação de etanol tornou-se cada vez mais reduzido. Relativamente aos valores de pH, foi notória a diminuição entre dia 24 e 27 de Dezembro, explicável pela formação de ácidos orgânicos e de CO<sub>2</sub> durante a fermentação, com a dissolução do último no produto no decorrer desta etapa. A partir desse momento, o pH manteve-se praticamente constante, com valores compreendidos entre 4,19 e 4,22, o que também indicava que a fermentação tinha terminado.

Desta forma, atendendo à estabilização dos valores, assumiu-se que a fermentação tinha chegado ao seu final no dia 30 de Janeiro, com uma percentagem de atenuação a rondar os 80,0%. Nesse mesmo dia, procedeu-se à purga da cerveja, de forma a retirar leveduras sedimentadas do fundo da cuba, por se considerar que normalmente estas camadas são constituídas por leveduras mortas que podem promover o desenvolvimento de *off-flavours* na cerveja. De seguida, definiu-se a temperatura da cuba para 4 °C, valor estipulado pela empresa para a maturação.

De forma semelhante, considerando a *Tabela 3* relativa à cerveja *lager*, Vadia Rubi, é possível observar uma redução dos valores de teor de sólidos solúveis, potencial alcoólico e pH desde o momento da inoculação das leveduras no dia 9 de Janeiro, até a uma posterior e expectável estabilização dos mesmos, a partir do dia 13 de Janeiro. Nesse mesmo dia, foi realizada a primeira purga da cerveja, sendo importante salientar que na empresa, no caso das cervejas *lager*, realizavam-se duas purgas. A primeira quando a atenuação rondava os 50%, o que neste caso não foi possível já que coincidiu com o fim de semana, e após o final da fermentação. Isto acontece, porque nas cervejas deste tipo, as leveduras possuem uma maior capacidade de floculação e sedimentam com maior facilidade ao longo da fermentação, originando o desenvolvimento de *off-flavours*, caso não se retirem as camadas de leveduras mortas na parte inferior da cuba atempadamente. No dia 15 de Janeiro, assumiu-se que a fermentação tinha terminado, definindo-se a temperatura para 4 °C, dando-se início à maturação da cerveja. No dia seguinte a cerveja sofreu a segunda purga.

Considerando a evolução da percentagem de atenuação das duas cervejas, tal como era esperado, é possível identificar, de forma concludente, a diferença destes dois produtos, no que diz respeito à levedura utilizada. Na cerveja *ale*, Vadia Trigo, a fermentação foi consideravelmente mais completa, com uma percentagem de atenuação superior à da cerveja *lager*, Vadia Rubi, com a primeira a rondar os 80,0% e a segunda a ficar-se pelos 70,8%.

Tabela 2 – Resultados das análises efetuadas à cerveja Vadia Trigo (C002) produzida durante o mês de Janeiro, com a respetiva percentagem de atenuação.

	<i>Dia do Mês de Janeiro</i>									
	23	24	25	26	27	28	29	30	31	
<b>Teor de sólidos solúveis (°Brix)</b>	12,4	10,2	Fim de Semana			7,10	6,70	6,40	6,50	6,40
<b>Potencial Alcoólico (% vol/vol)</b>	6,8	5,6				3,9	3,7	3,5	3,6	3,5
<b>pH</b>	-	4,52				4,18	4,15	4,19	4,22	4,16
<b>Atenuação (%)</b>	0	30,0				72,5	77,5	82,5	80,0	82,5

Tabela 3 – Resultados das análises efetuadas à cerveja Vadia Rubi (B145) produzida durante o mês de Dezembro, com a respetiva percentagem de atenuação.

	<i>Dia do Mês de Janeiro</i>							
	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Teor de sólidos solúveis (°Brix)</b>	15,1	14,0	Fim de Semana		8,90	8,80	8,90	9,00
<b>Potencial Alcoólico (% vol/vol)</b>	8,3	7,7			4,9	4,9	4,9	5,0
<b>pH</b>	-	4,75			4,50	4,46	4,57	4,52
<b>Atenuação (%)</b>	0	12,5			70,8	70,8	70,8	68,7

### 1.2.5 Determinação da viabilidade e concentração celular das leveduras

Como referido anteriormente, de modo a reaproveitar matérias primas e reduzir custos, a empresa recorria à recuperação, armazenamento e reutilização de leveduras após cada fermentação. No entanto, sabendo que existe um limite no número de inoculações consecutivas possíveis, procedeu-se à avaliação da viabilidade (% de células vivas) e concentração celular (nº de células/L de suspensão original) para determinar se as leveduras poderiam ser utilizadas numa nova fermentação. Na Tabela 4 são apresentados os resultados dessas mesma medições.

A empresa estipulou 70% como o limite mínimo de viabilidade celular necessário para a reutilização das leveduras numa nova inoculação. Deste modo, considerando os dados da tabela, percebe-se que apenas a levedura proveniente da cerveja Loira (C001) apresentou um valor de viabilidade celular inferior ao limite mínimo aceitável pela empresa, sendo, portanto, descartada. As restantes leveduras apresentaram valores de viabilidade celular superiores ao limite estipulado e, como tal, foram reinoculadas em novas produções de cerveja. Comparando as leveduras provenientes das cervejas Loira (C001) e Loira (C003), tendo em conta que as condições de armazenamento foram iguais, é possível perceber o impacto que o tempo de armazenamento tem na viabilidade celular das leveduras recuperadas, 64,50% e 82,42 % respetivamente, sendo que a primeira havia sido recuperada

no dia 27 de Janeiro e a segunda no dia 1 de Fevereiro, e ambas foram analisadas no dia 5 de Fevereiro. No decorrer do estágio, foi possível concluir que o tempo e a temperatura de armazenamento eram determinantes nos posteriores resultados à viabilidade celular das leveduras recuperadas, sendo que quanto menor o tempo e a temperatura de armazenamento melhores os valores deste parâmetro.

Por último, é importante voltar a frisar que a análise à viabilidade celular através da coloração com o corante vital azul de metileno, apenas serviu para estimar a percentagem de células vivas presentes nas suspensões de levedura, sendo que, seria importante, futuramente, determinar vitalidade das mesmas, por exemplo através do ensaio de acidificação do meio, de forma a obter resultados mais corretos.<sup>28</sup>

Tabela 4 – Resultados das análises de viabilidade (% células vivas) e concentração celular (nº de células vivas/L de suspensão) de suspensões de leveduras recuperadas e armazenadas a baixa temperatura, com fd a corresponder ao fator de diluição aplicado a cada amostra.

Origem	pH Cerveja	pH	fd	Número de células mortas	Número de células vivas	Número Total de células	Viabilidade celular (%)	Concentração Celular (células vivas/L suspensão original)
Preta (B142)	4,42	5,54	100	41	154	195	78,90	$4,89 \times 10^{11}$
Birrenta (B147)	4,45	4,62	50	87	378	465	81,30	$6,00 \times 10^{11}$
Rubi (B143)	4,56	5,38	100	38	177	215	82,33	$5,62 \times 10^{11}$
Rubi (B145)	4,52	4,40	100	52	162	214	75,70	$5,14 \times 10^{11}$
Extra (B146)	4,67	4,81	100	21	82	103	79,61	$2,60 \times 10^{11}$
Nautika (B148)	4,62	5,02	100	23	86	109	78,70	$2,73 \times 10^{11}$
Loira (C001)	4,24	4,52	50	121	203	324	64,50	$3,22 \times 10^{11}$
Loira (C003)	4,40	4,67	50	61	286	347	82,42	$4,54 \times 10^{11}$
Loira (C005)	4,44	4,94	100	33	96	129	74,42	$3,05 \times 10^{11}$
Birrenta (C006)	4,44	4,33	100	24	84	108	77,78	$2,67 \times 10^{11}$

## Capítulo III – Desenvolvimento de uma Nova Cerveja em contexto microcervejeiro

### 1. Definição de Novo produto e o seu ciclo de vida

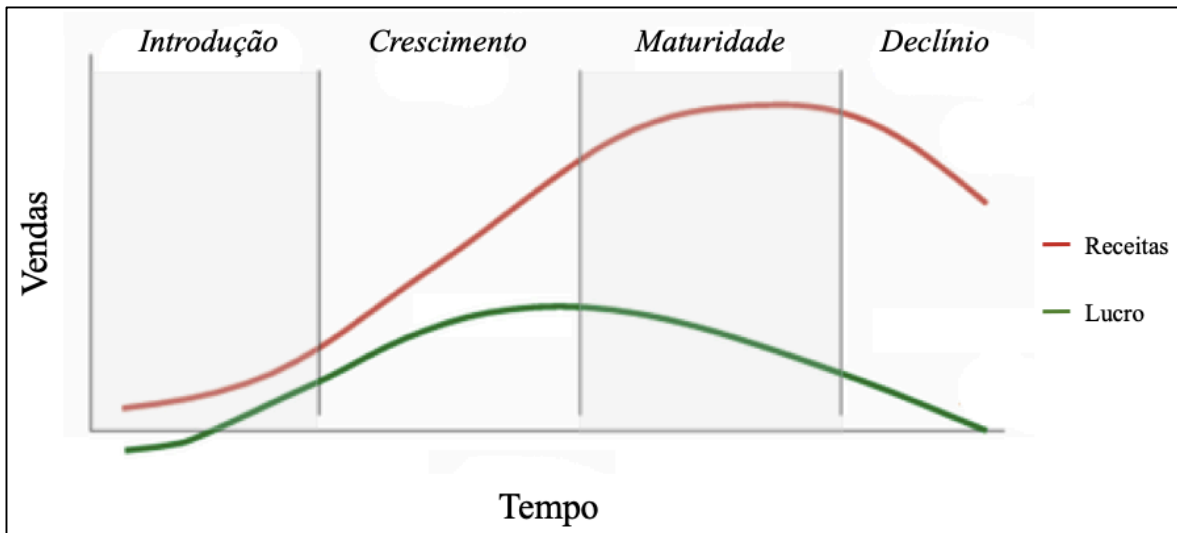
O conceito “novo produto” não requer necessariamente a invenção de algo inaudito. Pode considerar-se como novo algo: **1)** que nunca foi produzido ou comercializado por determinada empresa; **2)** introduzido numa nova área geográfica, apesar de ser um produto antigo da empresa; **3)** que sofreu alterações ao nível da embalagem/tamanho/formato; **4)** direcionado para um nicho específico do mercado.<sup>29</sup>

Os novos produtos, desde a sua introdução no mercado, atravessam um ciclo de vida que geralmente pode ser dividido em 4 etapas principais, tal como pode ser observado na Figura 20. Num período inicial, dá-se a introdução dos produtos no mercado, com as empresas a investirem bastante na promoção dos mesmos, recorrendo algumas vezes a demonstrações em loja ou a promoções e descontos, de forma a atrair o maior número de clientes possível. Nesta fase os lucros provenientes destes artigos são praticamente nulos e os custos para as empresas são bastante elevados.<sup>29,30</sup>

De seguida, os produtos atravessam uma fase de *crescimento* mais acentuado, com os clientes a comprarem de forma mais regular e eles próprios a funcionarem como publicitários do produto, dando-o a conhecer a novos potenciais consumidores. Durante este período, apesar dos custos continuarem elevados, os lucros começam a aumentar.<sup>29</sup>

Posteriormente, os produtos passam por uma fase na qual a taxa de crescimento das vendas abranda, estando esta redução associada, por exemplo, ao aumento da competição através do aparecimento de produtos concorrentes no mercado ou à fadiga e estado de indiferença do consumidor para com o produto. Eventualmente, as vendas acabam por estagnar e os lucros começam a ser cada vez menores. Esta fase é denominada *maduridade*.<sup>29</sup>

Por fim, os produtos entram numa fase de *declínio*, na qual as vendas diminuem e o custo associado à produção torna difícil a manutenção do produto no mercado. Artigos concorrentes ganham popularidade, o produto passa a ser cada vez menos lucrativo para a empresa e os custos para promover o mesmo tornam-se incontroláveis neste período. Habitualmente, é nesta fase que as empresas optam pela descontinuação do produto.<sup>29</sup>



**Figura 20** - Representação esquemática do ciclo de vida de um produto no mercado. Adaptado de (29).

Deste modo, tendo em conta as variações ao nível das vendas sofridas pelos produtos ao longo do seu trajeto comercial, torna-se evidente que a sustentabilidade das empresas assenta, também, no dinamismo apresentado pelas mesmas, através da introdução de novos produtos no mercado com sucesso, como meio de substituir de forma célere artigos anteriores que vão perdendo relevância para o consumidor.<sup>29</sup>

## **2. A importância e o processo de desenvolvimento de novos produtos**

A evolução e o crescimento de uma empresa não se podem desassociar, em parte, à constante introdução de produtos por parte da mesma. Através desta constante procura pela inovação, as empresas pretendem atingir determinados objetivos, como: a angariação de novos clientes, a expansão do negócio a nível geográfico, o aumento da taxa de lucro e das quotas de mercado e a elevação do entusiasmo em relação à marca.<sup>29</sup>

Do ponto de vista financeiro, o desenvolvimento de novos produtos é essencial para a sustentabilidade de qualquer negócio, incluindo os do setor alimentar. Vários estudos indicam que mais de 50% dos lucros de uma empresa estão associados a produtos que se encontram no mercado há menos de 5 anos. No entanto, a taxa de insucesso de um novo produto, que se define como a retirada deste do mercado após um período inferior a 5 anos, encontra-se normalmente nos 90%, o que indica que apesar da vital importância para as

empresas, o processo de desenvolvimento de novos produtos alimentares (DNPA) na maioria dos casos não é bem-sucedido.<sup>29,31</sup>

Relativamente, ao processo de desenvolvimento de novos produtos alimentares (DNPA), propriamente dito, geralmente tem uma duração que pode variar entre os 6 meses e os 5 anos, dependendo da dimensão da empresa e do grau tecnológico e inovativo necessário para tal.<sup>23</sup> Enquanto, empresas de dimensões mais consideráveis possuem várias equipas, ligadas a diferentes áreas (alimentar, legislativa, económica e marketing) a trabalharem em conjunto para o desenvolvimento de um novo produto, empresas de menor escala, normalmente, dependem de apoios exteriores (universidades e/ou laboratórios independentes) para poderem criar novos produtos bem sucedidos.<sup>29</sup>

A forma utilizada para o DNPA não é algo uniformizado, não existindo um consenso em relação às etapas que constituem todo este processo. Na Figura 21, é possível observar a sequência de etapas que compõem uma das metodologias para o desenvolvimento de novos produtos.<sup>29</sup>

De um modo geral, o DNPA tem início através da análise do mercado, atendendo às necessidades e tendências do mesmo naquele momento. De seguida, segue-se a etapa da geração de ideias, fortemente influenciadas pelo estudo de mercado realizado previamente.<sup>29</sup> Uma das técnicas mais comuns para o surgimento de novas ideias é o *brainstorming*, um método criativo de “*problem-solving*” em grupo, que, tal como o nome indica, consiste numa espécie de tempestade de ideias, cujo o objetivo é angariar o maior número possível de sugestões relacionadas com um tema geralmente pré definido. Para o sucesso deste método, seguem-se determinadas normas, como: a definição do tema a abordar; designação de um moderador, ficando essa pessoa responsável pela anotação de ideias e por coordenar de certa forma as intervenções de todos os elementos envolvidos; a ênfase da quantidade de ideias em detrimento da qualidade; e a tentativa de associação das ideias ao longo do processo.<sup>32</sup>

Posto isto, procede-se ao processo de verificação e triagem das ideias propostas, de modo a assegurar que a mesma vai de encontro com as necessidades do consumidor, imagem da empresa e competências da mesma. Nesta fase as empresas tentam identificar respostas para uma série de questões acerca do produto em si, do consumidor-alvo, da competição existente no mercado, dos locais de venda ou até mesmo do preço. Estas dúvidas tornam, porventura, a triagem de ideias a etapa mais crítica de todo o processo de DNPA, já que é nesta fase que

as empresas ponderam e decidem se devem ou não avançar com um novo projeto, investindo ou não recursos e tempo no mesmo.<sup>29,32</sup>

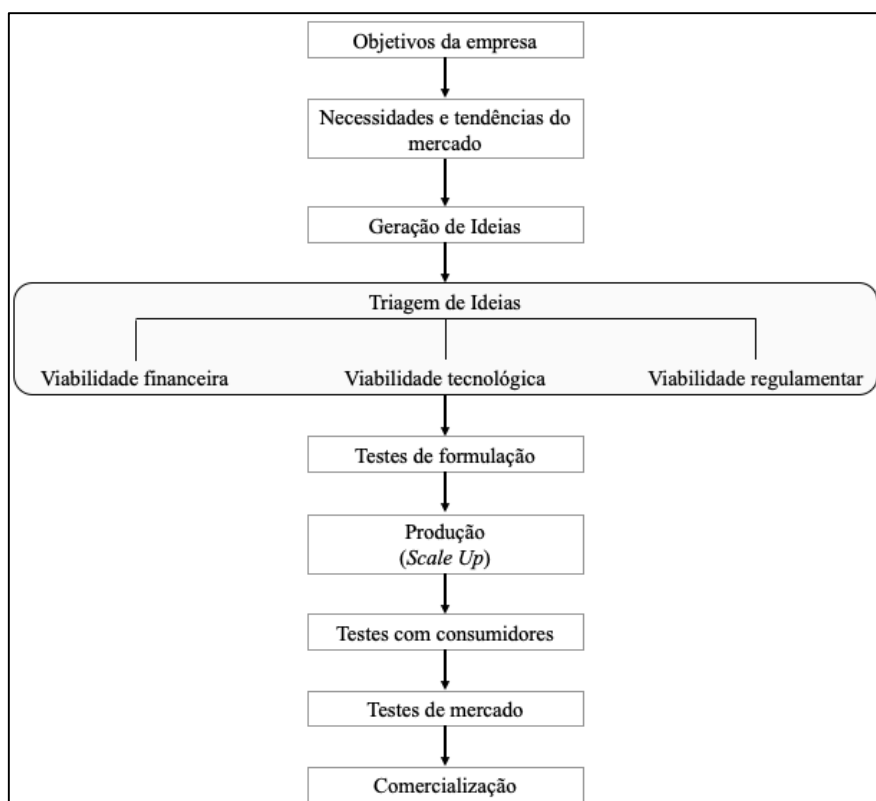
Durante a seleção da ideia, o produto passa ainda por uma fase de definição de conceito, ou seja, consideram-se todas as condições necessárias para garantir a criação de um novo produto de forma viável. Nesta fase, reúnem-se informações detalhadas acerca das especificações do produto, tendo em conta: **1) *formulação do produto***; **2) necessidades tecnológicas**, que envolvem instalações, equipamentos e processos necessários para fabricar o mesmo; **3) necessidades financeiras**, que englobam uma estimativa de todos os custos associados à produção e marketing do produto; **4) questões regulamentares**, de forma a garantir a segurança e conformidade do produto com as normas e legislação em vigor; **5) questões logísticas**, onde se deve considerar o raio de distribuição do produto ou até condições especiais para o transporte do mesmo (ambiente refrigerado, por exemplo); **6) validade**, já que é de extrema importância perceber por quanto tempo o produto preserva a sua qualidade do ponto de vista do consumidor.<sup>29,32</sup>

Quando finalizados os processos de triagem e definição do conceito do produto, passa-se para a fase de fabrico, com os testes de formulação, muitas vezes em simultâneo, com o estabelecimento de uma estratégia de marketing, tendo em conta a formulação, processo e embalagem do produto. Após a conclusão dos testes de formulação, dá-se o *Scale Up* ao nível da produção do produto em si, passando este a ser produzido a uma escala bastante superior. Nesta altura, à priori da comercialização do produto, em determinadas empresas são realizados testes de mercado, que constituem a primeira introdução do produto no mercado, no entanto, de forma controlada e meticulosamente delineada, isto é, com especificidades geográficas (pequena região) e tendo em conta o tipo de produto, lojas de retalho (devem ser utilizados futuros locais de venda) e o público alvo. Desta forma, a empresa consegue aferir como os consumidores/clientes, retalhistas e concorrentes reagem perante o novo produto, recolhendo informações/sugestões que podem ser essenciais para o sucesso do produto aquando introduzido no mercado definitivamente. De salientar, que estes testes aportam custos avultados para as empresas o que significa, que muitas vezes pequenas empresas optam por introduzir os produtos no mercado sem realizar os mesmos.<sup>29,33</sup>

Por último, estando o produto devidamente testado, procede-se à comercialização do mesmo e, tal como referido no ponto anterior, na fase de introdução no mercado, é de extrema importância a promoção do mesmo, recorrendo por exemplo: a cupões de descontos,



publicidade nas redes sociais ou até demonstrações em loja. Nesta fase, é de salientar também, a relevância da manutenção do produto, através da melhoria constante da qualidade (através da deteção de defeitos e otimização de todo o processo, desde o fabrico até à forma como o produto se encontra exibido nas prateleiras das lojas de retalho) e dos lucros provenientes do mesmo (reduzindo custos, encontrando fornecedores mais baratos, otimizando o processo e reduzindo a mão de obra não necessária).<sup>29,33</sup>



**Figura 21** - Representação esquemática do processo de Desenvolvimento de Novos Produtos.

Adaptado de (33).

### 3. Desenvolvimento estruturado de uma nova cerveja

Neste ponto serão descritos todos os passos envolventes no desenvolvimento de uma nova cerveja em ambiente empresarial, mais especificamente em contexto microcervejeiro. De realçar, que a ideia geral em relação a este novo produto já se encontrava definida pela empresa numa fase prévia à realização deste estágio, no entanto no decorrer do processo houve espaço para reformulações da mesma. Inicialmente, realizou-se uma pequena análise

ao setor alimentar e cervejeiro, com maior ênfase em Portugal, de modo a identificar a existência ou não de produtos semelhantes no mercado. Para tal, recolheu-se informação em sites e lojas de comércio online. De seguida, tendo em conta a intenção de desenvolver uma nova cerveja *Brut*, selecionou-se a ideia considerada mais promissora e definiu-se o conceito do novo produto. Após a determinação da viabilidade da nova bebida, obteve-se a formulação da cerveja, com o conseqüente aperfeiçoamento do processo de fabrico da nova cerveja.

### **3.1. Análise do mercado alimentar e cervejeiro, com foco em Portugal**

De acordo com um relatório da *FoodDrinkEurope* (2019), acerca dos dados e tendências da indústria alimentar na União Europeia, o setor alimentar é o que mais contribui para a economia europeia, à frente, por exemplo, da indústria automóvel. Para além disso, comparando com outros setores de fabrico, a indústria alimentar é líder em termos de valor acrescentado, empregabilidade e receita, apresentando um crescimento sustentado constante nos últimos 10 anos.<sup>34</sup> Segundo este estudo, os setores com maior significância dentro da indústria alimentar são: os produtos de pastelaria e farinhas, carnes, laticínios, bebidas e outros produtos variados (chocolate, bolachas, entre outros). Estes cinco grupos representam três quartos da receita e mais de 80% das empresas e empregos na indústria alimentar europeia. De referir, também, que quase a totalidade das empresas (99,1%) deste setor são PMEs (pequenas e médias empresas), representando, as últimas, cerca de 50% das receitas e dois terços do emprego no mercado alimentar.<sup>34</sup>

Segundo os números apresentados pela *FoodDrinkEurope*, em Portugal, especificamente, tal como na grande maioria dos países da União Europeia, a indústria alimentar foi o setor de fabrico com maior empregabilidade, com 16,8 biliões de euros de receita gerada por 11183 empresas, em 2017.<sup>34</sup>

Para além da perspetiva socioeconómica, este estudo demonstra, igualmente, que o setor alimentar tem vindo a evoluir, encontrando-se numa fase de enorme transformação digital, com as empresas a apostarem cada vez mais em ferramentas como: redes sociais, serviços móveis, lojas online, cibersegurança, robotização, entre outras. Da mesma forma, de acordo com a *FoodDrinkEurope*, o investimento em R&D (Investigação e Desenvolvimento, do inglês *Research and Development*) na indústria alimentar europeia, importante para a introdução de novos produtos, tem vindo a aumentar de forma sustentada, no entanto ainda

fica bastante aquém, quando comparado com o realizado por países como Austrália, Coreia do Sul e Estados Unidos da América. Tendo em conta o panorama europeu, Portugal surge no sétimo lugar em relação ao investimento privado em R&D no setor alimentar, atrás de países como a Finlândia, Holanda e Bélgica. O relatório faz também referência para a crescente consciencialização, por parte das empresas, em relação à necessidade de se tornar a indústria alimentar cada vez mais sustentável, através da implementação de medidas que visem a diminuição da emissão gases de efeito estufa e do desperdício alimentar.

Relativamente às tendências do setor, é possível perceber que os consumidores determinam as escolhas dos seus produtos alimentares, com base nos pontos enumerados de seguida: **1) prazer**, que continua a ser a principal razão de preferência por parte dos consumidores, que ambicionam experimentar alimentos e bebidas capazes de despertar vários sentidos; **2) produtos saudáveis**, entendidos pelo consumidor como produtos naturais, vegetais, de baixo teor calórico e/ou com benefícios médicos; **3) conveniência**, ou seja produtos fáceis de utilizar, rápidos de consumir, enquadrando-se num estilo de vida cada vez mais sobrecarregado; **4) ética**, porventura o parâmetro em maior crescimento, já que os consumidores encontram-se progressivamente mais informados e preocupados com questões ambientais e ecológicas e, como tal, procuram produtos sustentáveis e amigos do ambiente.<sup>34</sup>

Considerando, exclusivamente, o setor cervejeiro, em 2018, na União Europeia, a cerveja encontrava-se entre os dez produtos com maior volume de exportações, num valor superior a 3000 milhões de euros, tendo como principais destinatários países como: a China, Canadá e Rússia. Simultaneamente, nesse mesmo período, o volume de importações aumentou significativamente (cerca de 16 %), tendo sido despendidos cerca de 640 milhões de euros.<sup>34</sup>

Dentro do setor cervejeiro, a partir da década de 70 do século XX, começaram a surgir os primeiros cervejeiros artesanais nos Estados Unidos da América, responsáveis pela revolução no panorama cervejeiro do país. Atualmente, o movimento tem uma dimensão global, com o surgimento de várias empresas na Europa a partir do início do milénio. Em Portugal, de acordo com a Associação Portuguesa de Produtores de Cerveja (APVC), atualmente denominada Cervejeiros de Portugal, existem mais de 40 microcervejeiras a produzir mais de uma centena de marcas registadas.<sup>35</sup> Segundo um estudo publicado pela *Value Market Research* (2019) acerca do mercado global de cerveja artesanal, para além da expectável taxa de crescimento anual composta (CAGR) de 19,6% até 2024, também é

perceptível a crescente consciencialização e interesse do consumidor em relação ao mercado cervejeiro artesanal. De acordo com este estudo, isto deve-se à existência de uma enorme diversidade de sabores e à constante introdução de novos produtos, nomeadamente cervejas com baixo teor calórico e alcoólico. Ademais, a crescente tendência, particularmente dos mais jovens, em investir dinheiro em atividades de lazer (frequência assídua em pubs e restaurantes), aliada com o desejo por experienciar algo único e “premium”, são fatores que abonam a favor do setor artesanal.<sup>36</sup>

Considerando os diferentes estilos de cerveja existentes, sobretudo no mercado artesanal, é relativamente claro que o estilo mais popular é o *India Pale Ale* (IPA). Acredita-se que a denominação deste estilo teve origem numa tentativa, por parte do império britânico, em transportar cerveja até à Índia. Para tal, de modo a conservar o produto durante a viagem, de cerca de seis meses, decidiram adicionar uma quantidade superior de lúpulo, com o intuito de estender a validade da cerveja. O produto resultante tornou-se sobejamente apreciado, não só pela extensa validade, mas também pelas intensas características aromáticas. Mais tarde, devido ao aparecimento de novas técnicas de conservação, particularmente da refrigeração, o estilo foi-se dissipando, acabando por ser reinventado e revigorado nos Estados Unidos da América na década de 70 do século passado.<sup>37</sup>

Segundo a BJCP, uma cerveja pertencente ao estilo IPA deve satisfazer determinados critérios, entre os quais: a forte presença de lúpulo, conseqüentemente com uma intensidade aromática elevada e amargor, devendo também possuir um corpo menos acentuado, isto é, menor concentração de açúcares residuais. De acordo com a BJCP, dentro do próprio estilo, existem duas categorias: a *American IPA*, que é uma cerveja vista como o padrão deste estilo, que inclui todas as características mencionadas anteriormente; e a *Specialty IPA*, que se refere a cervejas com as mesmas características base de uma IPA, no entanto com algum parâmetro diferenciador, como por exemplo: a utilização de diferentes matérias primas, cor distinta, grau de carbonatação mais ou menos elevado, entre outros.<sup>38</sup>

Após ponderação e análise acerca das principais tendências do mercado alimentar e cervejeiro, sabendo que a empresa já havia apostado numa cerveja sem álcool (uma das tendências mais fortes do mercado cervejeiro, neste momento), optou-se, desta feita, pelo desenvolvimento de uma nova cerveja *Brut IPA*. Este produto acaba por pertencer ao estilo IPA, nomeadamente à categoria *Specialty IPA*. Contudo, num futuro próximo, as cervejas

*Brut* podem vir a pertencer a um estilo próprio, dada a crescente aposta neste tipo de produtos.

### **3.1.1. Cervejas *Brut***

A competitividade no setor cervejeiro e a constante procura pela inovação promove o desenvolvimento de novos produtos, tal como referido anteriormente, o que ao longo da história suscitou o aparecimento de novos estilos de cerveja e métodos para a obtenção da mesma. Segundo o *Beer Judge Certification Programme* (BJCP) existem mais de 30 estilos de cerveja distintos.<sup>38</sup>

As cervejas *Brut*, apesar de ainda não terem um estilo definido, surgiram com o propósito de mimetizar algumas das características de um espumante. Nestes casos, a cerveja resultante deve possuir um grau de carbonatação elevado e uma quantidade de açúcares residuais e turbidez reduzidas. O grau de carbonatação elevado destes produtos pode ser obtido por refermentação, designadamente através método tradicional/champanhês, ou por carbonatação forçada.

Tendo em conta o método champanhês, também designado por método tradicional, é normalmente efetuado na produção de champanhes e espumantes, tendo sido adaptado para a produção cervejeira. Este processo tem início através da segunda fermentação, o que significa que ocorre a inoculação de uma nova estirpe de levedura, neste caso levedura de espumante, e a adição de uma solução açucarada à garrafa com a cerveja ainda sem gás. Com a fermentação secundária dá-se a carbonatação natural da cerveja, ocorrendo também, normalmente, um aumento do teor alcoólico do produto.<sup>39</sup>

Usualmente, são utilizadas garrafas de champanhe, podendo ocorrer um processo maturativo prolongado, que se pode estender por vários meses ou até mesmo anos. Neste período, a cerveja vai maturar sobre as células de levedura mortas. Durante o processo de autólise, a levedura liberta compostos que vão afetar o produto final, em condições de temperatura e luz controladas. A cerveja deve maturar na horizontal, a uma temperatura a rondar os 12°C e em ambiente escuro, de modo a evitar a exposição a luz ultravioleta e a consequente degradação de compostos orgânicos.<sup>39</sup>

Após a fase de envelhecimento, as garrafas são dispostas em pupitres com o gargalo para baixo, num ângulo inicial a rondar os 45° que vai sendo aumentado ao longo do tempo. A inclinação da garrafa provoca a sedimentação das leveduras e de outros resíduos sólidos no

gargalo da mesma. Esta etapa tem a denominação de *rémuage*, tendo como objetivo a clarificação do produto.<sup>40</sup>

Posteriormente, a garrafa é sujeita ao processo de *degorgement*, que consiste no congelamento do gargalo, com a posterior abertura da garrafa e remoção do depósito sólido formado previamente. O precipitado é expulso devido à pressão imposta pelo gás presente no líquido, neste caso cerveja.<sup>40</sup> Por último, o nível da cerveja na garrafa é ajustado, seguindo-se a inserção da rolha de cortiça.

Neste tipo de cervejas a adição enzimática, particularmente, da amiloglucosidase (1,4-alfa-glucosidase de glucano, EC 3.2.1.3) é bastante comum. A amiloglucosidase é uma exoglucosidase, que deriva de uma estirpe selecionada de *Aspergillus niger*, capaz de hidrolisar ambas as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6 do amido, originando monómeros de glucose. As vantagens provenientes da utilização desta enzima residem no aumento da conversão do amido em açúcares fermentescíveis, na minimização dos hidratos de carbono residuais e no aumento do grau de atenuação.<sup>41</sup> Como consequência, a cerveja final vai ser extremamente seca, com uma densidade relativa bastante baixa e uma quantidade de açúcares residuais praticamente inexistente.

### **3.2. Triagem de ideias**

Para a seleção da ideia mais promissora, teve-se em conta o panorama do mercado alimentar e cervejeiro atual, sendo que simultaneamente procedeu-se à identificação do público-alvo deste produto, assim como os possíveis hábitos de consumo associados ao mesmo e à existência ou não de concorrência ao nível nacional.

Relativamente, ao público-alvo percebeu-se que uma cerveja *Brut* IPA destinar-se-ia a qualquer adulto apreciador de cerveja e/ou espumante, visto que o produto iria englobar características associadas a ambas as bebidas. Para além disso, tendo em conta a escassa existência de produtos semelhantes no mercado cervejeiro artesanal português, seria expectável que os consumidores, nomeadamente mais jovens, tivessem interesse e curiosidade em experienciar um produto bastante diferente do usualmente comercializado.

Considerando os possíveis hábitos de consumo associados a esta bebida, ficou relativamente claro que se enquadraria nos locais de consumo de cerveja habituais, isto é, restaurantes, bares, pubs ou em casa. Tendo em conta o momento de consumo, depreendeu-se que o facto desta cerveja possuir características de espumante, impulsionaria a utilização e

o consumo da bebida em ambientes festivos, porventura, substituindo o espumante. De qualquer modo, para além da adequação para celebrações, percebeu-se igualmente que uma cerveja *Brut* IPA seria bem aceite em praticamente qualquer momento de lazer e convívio, com especial destaque para todos os amantes de cerveja artesanal.

Por fim, analisando a possível concorrência no mercado percebeu-se que a presença de cervejas semelhantes em Portugal é muito escassa. Tendo em conta, produtos internacionais é possível referenciar algumas cervejas *Brut* vendidas em território português, como: a cerveja “*Deus: Brut des Flandres*”, provavelmente a cerveja *Brut* de maior renome em todo o mundo, da cervejaria belga Bosteels Brewery e a cerveja “*Too...Brutylicious*” da cervejaria irlandesa *Third Barrel Brewing*. No contexto português a concorrência é, de igual forma, bastante reduzida, sendo que os principais competidores, com produtos semelhantes no mercado são: a cervejaria *Cinco Chagas*, com a cerveja “*Extra Brut IPA*” e a cervejaria *MUSA*, com a cerveja “*David Brut*”.

### **3.3. Determinação da viabilidade da nova bebida: Definição do conceito**

Tal como referido anteriormente no *Ponto 2* deste capítulo, após a seleção da ideia mais promissora é necessário definir o conceito do produto e determinar a viabilidade do mesmo, tanto a nível financeiro, como tecnológico e regulamentar.

Selecionou-se a cerveja *Brut* IPA como a ideia mais promissora para o desenvolvimento de um novo produto alimentar na empresa Essência D’Alma Lda. Tendo em conta o *Codex Alimentarius*, este produto pertence à categoria 14.2.1 (Cerveja e Bebidas maltadas), ou seja, consiste numa bebida alcoólica resultante da utilização de malte (cevada maltada), lúpulo, levedura e água.<sup>42</sup> O desenvolvimento deste novo produto teve como desígnio a obtenção de uma cerveja vincadamente aromática, efervescente e seca, com o intuito de proporcionar ao consumidor uma sensação que conjuga características de dois tipos de bebidas distintos (cerveja e espumante), originando um produto refrescante e intenso a nível de sabor e aroma, que deve ser servido e ingerido a uma temperatura até aos 12°C.

Tendo em conta o público alvo, considerando os números da OMS (Organização Mundial de Saúde) de 2016, disponíveis no website *OurWorldInData*, em média uma pessoa com idade superior a 15 anos consumiu 6,4 litros de álcool nesse ano. No entanto, a Europa apresentou valores significativamente superiores, sendo que em Portugal em média foram ingeridos 12,3 litros de álcool, com 30,8% desse volume a corresponder ao consumo de

cerveja. Relativamente ao género dos consumidores, é perceptível que o público masculino apresenta um consumo de bebidas alcoólicas consideravelmente superior ao feminino. Em 2010, jovens adultos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 15 e os 19 anos, consumiram em média 20 litros de álcool, enquanto consumidores femininos, na mesma faixa etária, apresentaram um consumo de 8 litros de álcool, ou seja, menos de metade.<sup>43</sup> Assim, tal como referido anteriormente, era expectável que este produto se destinasse ao público adulto, consumidor de bebidas alcoólicas e apreciador de cerveja, perspetivando-se um maior interesse por parte dos consumidores jovens do sexo masculino.

A nível comercial, era expectável que a bebida estivesse disponível durante todo o ano em estabelecimentos pertencentes ao canal HORECA (hotéis, restaurantes e cafés), mas também nas grandes superfícies com a quais a empresa já colabora. Para além disso, perspetivava-se a disponibilidade da cerveja no próprio *Brewpub* da empresa.

Atendendo ao processo cervejeiro, percebeu-se que o fabrico da nova cerveja, onde se incluem as matérias primas, equipamentos, etapas e métodos utilizados, seria muito semelhante, numa fase inicial, ao da maioria das cervejas já comercializadas pela empresa. A nível tecnológico e da formulação do produto, a grande diferença iria residir na utilização da enzima amiloglucosidase e no grau de carbonatação mais elevado.

Do ponto de vista regulamentar, tendo em conta um artigo publicado pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), a utilização da enzima amiloglucosidase no processo cervejeiro não provoca qualquer efeito adverso observável para a saúde humana e apresenta uma probabilidade de ocorrência de reações alérgicas muito reduzida, caso seja utilizada de acordo com as condições de uso estipuladas.<sup>44</sup> De acordo com a Comissão Europeia, o uso desta enzima é considerado seguro para aplicações na indústria cervejeira e cumpre com as especificações de pureza recomendadas para enzimas de grau alimentício. Porém, deve utilizar-se a dose mínima necessária para alcançar a reação enzimática desejada. Posto isto, tendo em conta as doses recomendadas, expressas em unidades de atividade enzimática, para aplicações relacionadas com o processo cervejeiro ou bebidas à base de cereais é recomendada uma dose nunca superior a 4100 AGU (unidade de amiloglucosidase, que é definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de maltose por minuto sob condições padronizadas) por quilograma de matéria seca de amido.<sup>45</sup>



### 3.4. Testes de formulação

No decorrer do desenvolvimento do novo produto, não se efetuaram testes de formulação, visto que o desenvolvimento da formulação do produto teve a colaboração e o apoio da cervejeira brasileira Albanos.

Atualmente, a cervejeira Albanos já possui e comercializa uma cerveja semelhante à pretendida durante este estágio (Albanos *Brut* IPA) e, como tal, o conhecimento e informações transmitidos por representantes da cervejaria brasileira foram cruciais para a obtenção da formulação da cerveja desenvolvida durante este estágio.

Complementarmente, para a obtenção da receita da cerveja base, recorreu-se ao software *Beersmith*, que é utilizado pela empresa para a elaboração e ajuste das receitas de praticamente todos os produtos. Este software garante um controlo mais eficaz relativamente às características do produto final, através da previsão de parâmetros como: teor alcoólico, IBU (*International Bittering Unit*), cor e densidade relativa da cerveja final, tendo em conta o tipo e quantidade de matérias primas utilizadas.

Deste modo, as informações transmitidas pela cervejaria Albanos, em simultâneo com a utilização do software *Beersmith*, foram ferramentas essenciais para a obtenção da formulação da cerveja *Brut* IPA desenvolvida.

### 3.5. Produção da cerveja

Quanto à produção da cerveja em si (*Figura 22*), seguiram-se as etapas descritas no Capítulo I, mais especificamente no *Ponto 2 – Processo cervejeiro*. Primeiramente, deu-se a moagem do malte, sendo que apenas no dia seguinte se deu início à produção de 1000 L de mosto. Para tal, foram realizadas de forma sequencial as etapas da brassagem, filtração do mosto e ebulição do mesmo, com a adição dos lúpulos *Cascade* e *Chinook* nesta fase para a confeção de amargor. Posto isto, o mosto foi transferido para o *Whirlpool*, onde foi clarificado e arrefecido, sendo que logo de seguida, o volume de mosto resultante, a rondar os 953 L, foi transferido para uma cuba cilíndrica de 1000L. Posteriormente, o mosto foi arejado, seguindo-se a inoculação direta, pela parte superior da cuba, de 500g da levedura *SafAle US-05* da Fermentis, com o controlo de temperatura a ser estipulado para os 18°C.

Assim que a fermentação arrancou, perceptível através da diminuição significativa do teor de sólidos solúveis, adicionaram-se cerca de 90 mL da enzima *ABV glucoamylase 400 (GAG 511)* da AB Vickers.

Posto isto, a fermentação decorreu normalmente, até à estabilização dos valores de teor de sólidos solúveis (°Brix) e potencial alcoólico, que indicavam o final desta etapa. Neste momento, definiu-se a temperatura da cuba para os 3°C, de modo a iniciar-se a maturação do produto. Durante este período realizou-se o *dry hopping* da bebida, tal como descrito no ponto *1.1.1 – Dry Hopping*, do Capítulo II, com a utilização de 3 kg do lúpulo da variedade *Cascade*.

Após um período de dez dias, deu-se a filtração da cerveja, de acordo com o processo de filtração por terras descrito no ponto *1.1.2 – Filtração*, do Capítulo II. No dia seguinte, devido a questões logísticas e outras necessidades de produção da empresa, a cerveja teve de ser retirada da cuba, sendo transferida quase na totalidade para barris de 50 L, previamente higienizados, e armazenada em condições de refrigeração a rondar os 8°C. O produto reminescente, cerca da 200L, foi transferido para uma barrica, que anteriormente havia contido o destilado *Aquavit*, uma bebida alcoólica, bastante popular nos países escandinavos, particularmente na Dinamarca, com características aromáticas intensas, que se devem especialmente à utilização da planta alcaravia, onde ficou durante um período a rondar os três meses.

Após o período de envelhecimento da cerveja em barrica, realizou-se a transferência de todo o produto (cerveja em barris + barrica) de volta para a cuba, estipulando-se a temperatura para os 4°C.

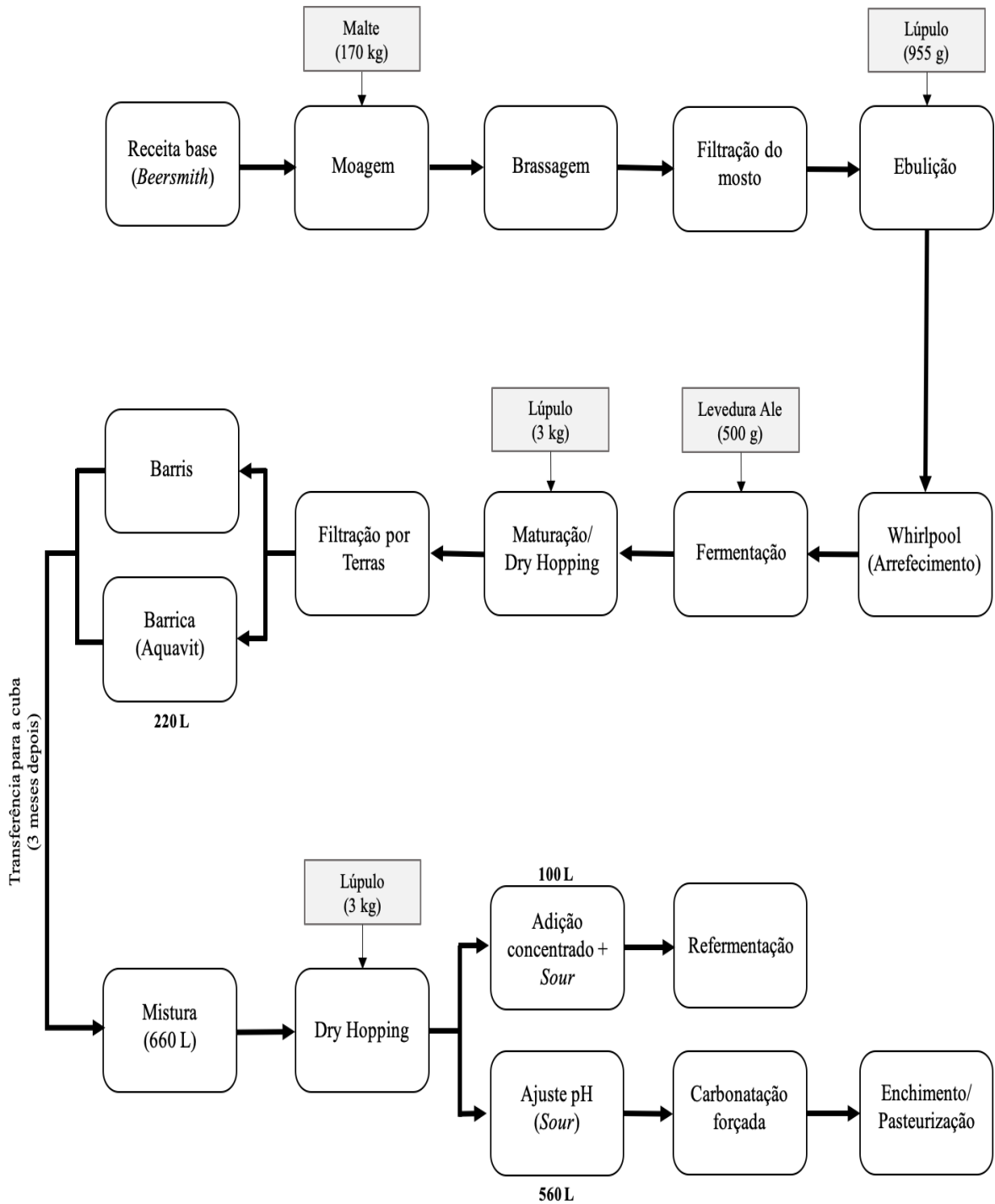
No dia seguinte, realizou-se novo processo de *dry hopping*, visto que a cerveja já não apresentava a intensidade aromática desejada. Pela primeira vez, recorreu-se ao equipamento de filtração por terras (Figura 16), para a concretização deste método, com o lúpulo (3 kg de *Cascade*) a ser introduzido diretamente no reservatório B do equipamento. Esta decisão teve como base a maior capacidade volumétrica deste equipamento, com o intuito de prolongar o tempo de contacto entre a cerveja e o lúpulo e, conseqüentemente, aumentar a extração e solubilização dos compostos aromáticos do mesmo na bebida.

Desta feita, retiraram-se 100 L da cerveja para barris de 50 L, previamente higienizados, armazenando os mesmos em ambiente refrigerado, a uma temperatura a rondar os 8°C. Mais à frente, a esta porção da bebida foi adicionado concentrado de maçã (rico em açúcares

fermentescíveis, particularmente frutose), que iria funcionar como substrato para uma segunda fermentação. Complementarmente, foi adicionada *Sour*, outra cerveja produzida pela empresa, obtida por fermentação mista em barrica. Através da adição de concentrado e com os microorganismos provenientes da cerveja *Sour*, pretendia-se que o produto sofresse uma segunda fermentação em garrafa, com a conseqüente carbonatação do mesmo. Esta porção da cerveja produzida foi denominada ***Brut IPA 2***.

Relativamente à cerveja que permaneceu em cuba, foram adicionados cerca de 77 L de cerveja *Sour*, neste caso, apenas para ajustar o pH para um valor inferior, mais próximo do de um espumante (geralmente a rondar valores de pH entre 3,15-3,30). Após a adição de *Sour*, com a conseqüente acidificação do produto, procedeu-se à carbonatação da cerveja por injeção de CO<sub>2</sub>, tal como descrito no ponto 1.1.3 – *Carbonatação*, do Capítulo II. Esta etapa teve uma duração a rondar as 20 horas, contrastando com as habituais 4 horas realizadas para as outras cervejas da empresa. A carbonatação deu-se por terminada, quando a pressão na cuba indicava um valor próximo de 1,90 bares. Esta porção da cerveja produzida foi designada por ***Brut IPA 1***.

De seguida, deu-se o enchimento e encapsulamento da cerveja, com pasteurização apenas do produto que permaneceu na cuba (***Brut IPA 1***). Para tal, foram utilizadas garrafas de espumante de 75 cL, com encapsulamento preferencial com rolhas de cortiça de dois discos (*2D Beer* – R2D). Contudo, tendo em conta o protocolo para a análise do impacto do tipo de vedante no envelhecimento da cerveja, em parceria com o Grupo Amorim, mais especificamente com a empresa Champcork S.A., foram encapsuladas, para cada tipo de vedante, quatro garrafas de porção da cerveja (***Brut IPA 1 e Brut Ipa 2***), sendo que foram utilizados três tipos de vedantes distintos, mais concretamente: as rolhas de dois discos (R2D) acima referidas, as rolhas de um disco Neutocork Beer (RN) e a cápsula metálica (CM) utilizada em praticamente todos os produtos da empresa.



**Figura 22** – Processo de fabrico da cerveja Brut IPA.

## **4. Análises e caracterização do produto**

Durante e após o fabrico da cerveja, foram realizadas análises de modo a seguir o desenvolvimento do produto. Para além disso, é de importante salientar que este trabalho tinha como objetivos a realização de alguns procedimentos para a caracterização do perfil volátil da cerveja, assim como, a análise acerca do impacto que diferentes tipos de encapsulamento na evolução do produto em garrafa ao longo do tempo. A realização destas análises não foi possível no decorrer do período de estágio, tendo em conta a situação pandémica, no entanto, neste ponto do relatório é possível encontrar informação de suporte à realização das mesmas.

### **4.1. Metodologias para a análise e caracterização do produto**

#### **4.1.1. Análise aos parâmetros físico químicos da cerveja**

Tal como descrito anteriormente no ponto 1.1.5 – Análise dos parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba, do Capítulo II, de forma a monitorização da cerveja durante todas as etapas do seu fabrico foram realizadas algumas análises tendo em conta os equipamentos disponíveis na empresa. Estas medições tinham como objetivo o seguimento de várias etapas relativas à produção da cerveja e a identificação de eventuais problemas de qualidade do produto, como a deterioração ou contaminação do mesmo.

As medições efetuadas pretendiam aferir determinados parâmetros que incluíam: pH, teor de sólidos solúveis, turbidez e concentração de oxigénio na cerveja.

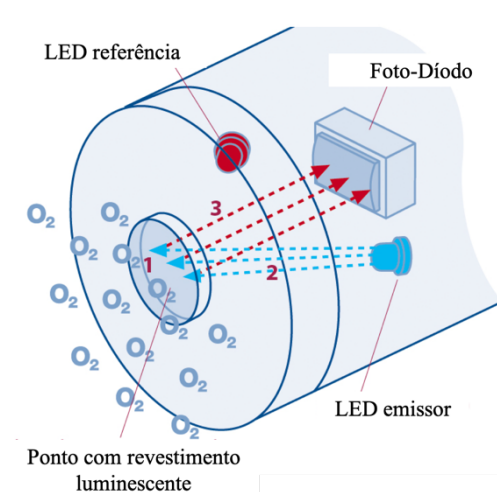
A determinação do pH foi obtida por potenciometria, através de um elétrodo de pH digital edge® (HI10480 da marca Hanna Instruments) com sensor de temperatura incorporado. Para cada medição, elétrodo de pH, previamente calibrado recorrendo a soluções tampão com valores de pH distintos, foi mergulhado completamente na amostra a analisar até à sua junção. Posteriormente, aguardou-se cerca de 1 minuto até à estabilização do valor de pH, repetindo-se este processo até serem obtidas duas medições iguais consecutivas para a mesma amostra. Por fim, entre cada medição de diferentes amostras ou no final de todas as medições, o elétrodo foi higienizado, sendo enxaguado com água em abundância.

Quanto à determinação do teor de sólidos solúveis (°Brix), que permitia obter uma estimativa da quantidade de açúcares ainda presentes nos produtos ao longo do seu fabrico, utilizou-se um refratómetro digital portátil (HI96813 da marca Hanna Instruments). Para cada análise, com o auxílio de uma pipeta de plástico, 3 gotas de amostra foram transferidas para o compartimento do aparelho destinado à mesma, sendo que de seguida se premiu o botão “read” para a realização de cada medição. De modo complementar, o refratómetro tinha também capacidade de estimar o potencial alcoólico (em %vol/vol) de cada produto, tendo em conta a quantidade de açúcares presentes no mesmo. Para tal, após a medição do °Brix premiu-se o botão “range”, que permitiu a obtenção do teor alcoólico provável do produto final. À semelhança das medições de pH, estas análises repetiram-se até à obtenção de dois valores de °Brix e potencial alcoólico iguais e consecutivos em cada amostra.

Relativamente à medição da turbidez do produto recorreu-se a um turbidímetro (2100Q da marca HACH). Este equipamento indicava a concentração de partículas em suspensão na amostra, através da medição da dispersão da luz incidente pela amostra quando se faz incidir um feixe de luz na mesma. Os valores foram obtidos em unidades FTU (Unidades de Formazina de Turbidez), estando estes relacionados com as unidades EBC (do inglês *European Brewery Convention*) através da seguinte razão:  $1 \text{ FTU} = 0,25 \text{ EBC}$ .<sup>24</sup> Para cada análise, cerca de 15 mL de amostra foram depositados num recipiente próprio, pertencente ao equipamento. De seguida, o exterior do recipiente foi limpo com um material próprio, para evitar eventuais erros associados à sujidade do mesmo, sendo logo de seguida colocado no turbidímetro, numa posição específica. Por fim, seleccionou-se o botão “read” de forma a obter o valor de turbidez da amostra. À semelhança das análises anteriormente referidas, as análises repetiram-se até à obtenção de dois valores de turbidez iguais e consecutivos.

Para a determinação do oxigénio dissolvido no produto ao longo do seu fabrico, foi utilizado o equipamento *Orbisphere* 3100 da HACH. Este equipamento permite a obtenção de medições precisas em relação à concentração de oxigénio dissolvido nas bebidas em cuba, através da tecnologia luminescente de oxigénio dissolvido (LDO) (*Figura 23*). De um modo geral, os equipamentos com esta tecnologia têm como base quatro componentes: um LED (emissor de luz azul), um LED referência (emite um sinal conhecido, que serve como referência), um foto-díodo (detetor de luz) e um ponto com revestimento luminescente, exposto à amostra. Basicamente, o LED emite um pulso de luz azul que vai incidir no ponto com revestimento luminescente, sensível ao oxigénio. A incidência de luz neste ponto vai

originar uma reação de luminescência, que vai originar a emissão de um pulso de luz vermelha, detetada pelo foto-díodo. A presença de oxigénio afeta as características da luz luminescente, sendo que quanto maior a concentração de oxigénio em contacto com o ponto com revestimento, menor a intensidade e a duração da luz vermelha.<sup>46</sup>



**Figura 23** – Representação esquemática do funcionamento da tecnologia LDO. Adaptado de (46).

#### 4.1.2. Análise sensorial

A avaliação sensorial de produtos alimentares, é um método científico amplamente utilizado na indústria alimentar, onde se inclui o setor de bebidas alcoólicas, para medir, analisar e interpretar as reações às características de um produto, influenciadas pelos sentidos da audição, olfato, paladar, tato e visão. De entre os vários tipos de testes utilizados para a análise sensorial de um produto, destacam-se os testes discriminativos (ou de diferenciação), os testes descritivos e os testes afetivos.<sup>47</sup>

Os testes discriminativos, têm como propósito identificar se existe alguma diferença sensorial detetável entre amostras ou perceber se existem diferenças em relação a um atributo em específico. Este tipo de testes tem como base a comparação entre um número limitado de amostras, sendo que os provadores são normalmente instruídos a escolher apenas uma dessas amostras, tendo em conta determinada característica.<sup>47</sup>

Quanto aos testes de descritivos, normalmente são realizados por indivíduos especializados, isto é, devidamente treinados e capazes de identificar e quantificar determinados atributos de um produto, através dos diferentes sentidos. Comparando com os testes de diferenciação, apesar destes métodos serem bastante mais abrangentes, informativos e menos propensos a resultados erróneos, visto que são efetuados por um painel devidamente treinado, a sua realização pode ser mais difícil e dispendiosa, pelo simples facto de existir a necessidade do painel de provadores ser devidamente treinado.<sup>47</sup>

Finalmente, os testes afetivos têm como propósito a identificação das preferências dos consumidores e o grau de aceitação dos mesmos perante determinado produto. Estes testes têm como base a utilização de escalas hedónicas, que normalmente são escalas ordinais ou nominais, facilmente compreensíveis, facilitando a realização destes testes por parte dos consumidores. A nível de análise estatística, quanto maior o número de provadores envolvidos, maior vai ser a acuidade e sensibilidade do teste, visto que existe uma enorme variabilidade em relação às preferências individuais de cada consumidor.<sup>47</sup>

#### **4.1.3. Análise da composição volátil dos produtos**

De modo a analisar o perfil de compostos voláteis, responsáveis pela confeção de aroma e sabor à cerveja, era necessário efetuar uma análise à composição volátil da bebida. Simultaneamente, tendo em conta um protocolo colaborativo da empresa Essência D'Alma com a empresa do grupo Amorim, Champcork S.A., havia a intenção de analisar o impacto que três tipos de vedantes distintos (R2D, RN e CM), referidos no ponto 3.5 – *Produção* do Capítulo III, teriam no perfil de compostos voláteis das duas variedades da cerveja produzida (**Brut IPA 1** e **Brut IPA 2**). Para tal, era necessário recorrer-se ao processo de microextração em fase sólida em espaço de cabeça e análise de cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massa (HS-SPME/GC-MS).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica simples, rápida e eficiente. Geralmente, a SPME pode ser dividida em três etapas: 1) dá-se a absorção do soluto da matriz da amostra para uma fibra absorvente (fase estacionária) colocada no *headspace*; 2) atinge-se o equilíbrio na concentração de soluto na fase estacionária; 3) o analito é transferido para o sistema de cromatografia. Uma das grandes vantagens deste método reside na eliminação da necessidade de utilizar solventes para a pré-concentração dos compostos voláteis.<sup>48</sup>



Esta técnica permite o acoplamento de um cromatógrafo com um espectrômetro de massa, o que, por sua vez, possibilita a combinação da alta seletividade e eficiência separativa da cromatografia de gás e a obtenção de informação estrutural e de massa molecular da espectrometria de massa. Este método é comumente utilizado para a análise de compostos voláteis termicamente estáveis, quando submetidos às elevadas temperaturas da separação cromatográfica.<sup>49</sup>

## 4.2. Resultados e discussão

### 4.2.1. Análise aos parâmetros físico químicos da cerveja ao longo da sua produção

Na empresa foram realizadas uma série de análises físico-químicas ao produto ao longo de todo o seu processo de fabrico. Todas as análises referidas neste ponto foram realizadas na empresa Essência D'Alma. Os resultados das mesmas encontram-se reunidos nas seguintes tabelas (*Tabela 5, Tabela 6, Tabela 7, Tabela 8*).

Tendo em conta os dados relativos ao parâmetros de pH, teor de sólidos solúveis e potencial alcoólico da *Tabela 5*, é possível constatar que o mosto, produzido no dia 25 de Novembro de 2019, apresentou um teor de sólidos solúveis à volta dos 11,9 °Brix, com um potencial alcoólico de 6,6 %vol/vol e um pH de 4,99. Durante a fermentação, tal como esperado, esses valores foram diminuindo, até estabilizarem a partir do dia 30 de Novembro. No dia 3 de Dezembro, dada a inalteração destes valores, deu-se a fermentação como concluída, alterando-se a temperatura da cuba para os 3 °C, para se dar início à maturação da cerveja. No dia 19 de Dezembro efetuou-se a filtração da cerveja por terras, que não teve um impacto significativo nestes parâmetros.

Tabela 5 – Resultados das medições de pH, teor de sólidos solúveis (°Brix) e potencial alcoólico (%vol/vol) do produto ao longo dos meses de Novembro e Dezembro de 2019.

Mês	Novembro						Dezembro			
Etapa	Produção do mosto	Fermentação						Filtração por Terras		
Dia	25	26	27	28	29	30	1	2	3	19
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	11,9	11,5	10,1	7,50	5,80	4,40	4,30	4,30	4,50	4,50
Potencial Alcoólico (%vol/vol)	6,6	6,3	5,5	4,1	3,2	2,4	2,4	2,3	2,5	-
pH	4,99	4,98	4,66	4,16	4,00	4,00	4,00	4,10	4,00	4,18

Relativamente aos resultados da *Tabela 6*, foi perceptível que os cerca de três meses de armazenamento da bebida em barris (em ambiente refrigerado) e na barrica, não tiveram um

praticamente nenhum impacto nos valores de pH e teor de sólidos solúveis. A estabilização dos valores de pH, sem a acidificação da bebida, constituiu um indicador positivo em relação à ausência de contaminações ao longo do fabrico do produto até então. De forma semelhante, a realização do *Dry Hopping* não provocou qualquer alteração nestes parâmetros.

No dia 5 de Março, após a retirada dos 100 L de cerveja destinados à posterior refermentação (**Brut IPA 2**), efetuou-se a adição de cerca de 77 L de *Sour* (pH = 3,10) à restante cerveja que permaneceu na cuba, o que levou à redução do pH para 3,88 (valor mais próximo ao de um espumante Bruto, que normalmente apresenta valores a rondar os 3,15-3,30). Nesse mesmo dia, deu-se início à carbonatação mecânica do produto, que terminou no dia seguinte, não suscitando alterações significativas nos valores de pH e teor de sólidos solúveis da cerveja (**Brut IPA 1**).

Relativamente à porção da bebida destinada à refermentação (**Brut IPA 2**), foi notório o aumento dos valores de teor de sólidos solúveis, provocado pela adição de 4,5 L de concentrado de maçã (70 °Brix). Quanto ao pH, também foi perceptível a diminuição do mesmo, explicável pela adição de 30 L de *Sour*.

Tabela 6 – Resultados das medições do pH e teor de sólidos solúveis (°Brix) da bebida ao longo dos meses de Março e Abril de 2020.

Mês	Março				Abril	
Etapa	<i>Dry Hopping</i>	Adição de <i>Sour</i> Carbonatação mecânica			Refermentação ( <i>Sour</i> + Concentrado de maçã)	
Dia	3	4	5	6	4	
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	4,80	4,80	4,80	4,70	4,50	6,80
pH	4,18	4,18	3,88	3,80	4,14	3,85
		<b>Brut IPA 1</b>			<b>Brut IPA 2</b>	

A partir da análise dos resultados da *Tabela 7*, verificou-se que as etapas de filtração por terras e *Dry Hopping* influenciaram grandemente os valores de turbidez da cerveja, sendo que a efetuação de ambas provocou uma redução acentuada na turbidez do produto. Relativamente à etapa de filtração, foi possível constatar que o produto passou de uma

turbidez inicial de 199 FTU para um valor final de 6,95 FTU. Quanto ao *Dry Hopping*, observou-se uma descida dos valores da turbidez de 59,8 FTU para 9,46 FTU.

Considerando a escala EBC (*Anexo 1*)<sup>50</sup>, a cor da cerveja após a realização de ambos os processos deveria tender para tons âmbar (relativamente escura). Contudo, a cor observável após ambos os processos foi bastante clara e amarelada. Sabendo que as unidades EBC, para além da cor, também se referem à turbidez da cerveja, é possível explicar a disparidade, entre os resultados observáveis e absolutos, devido à capacidade que o turbidímetro utilizado possui para corrigir a interferência da cor da amostra, analisando exclusivamente a turbidez da mesma.

De referir, que todas as medições foram realizadas a temperaturas relativamente baixas (a rondar os 2-3 °C), o que poderá ter dado origem à chamada turbidez a frio (do inglês, *chill haze*), provocada pela interação entre polifenóis e proteínas.<sup>51</sup> A realização de novas medições a temperaturas superiores poderia resultar em valores de turbidez inferiores.

Tabela 7 – Resultados relativo à turbidez do produto, em FTU, antes e após a realização das etapas de filtração por terras e *dry hopping*, com T<sub>i</sub> a corresponder à turbidez inicial e T<sub>f</sub> à turbidez final.

<b>Data</b>	<b>19/12/2019</b>	<b>04/03/2020</b>
<b>Etapas</b>	<b>Filtração por Terras</b>	<b>Dry Hopping</b>
<b>T<sub>i</sub> (FTU)</b>	199	59,8
<b>T<sub>f</sub> (FTU)</b>	6,95	9,46
<b>EBC</b>	27,8	37,8

Observando os dados da *Tabela 8*, concluiu-se que a concentração de oxigénio dissolvido (OD) na cerveja, em ppb, teve um aumento significativo devido à etapa correspondente à filtração por terras, no entanto, após os processos de *dry hopping* e carbonatação verificaram-se reduções acentuadas nesse mesmo parâmetro.

Assim, foi possível inferir que a utilização do filtro de terras, apesar de trazer algumas vantagens, sobretudo ao nível da redução da turbidez do produto, provocou um aumento bastante acentuado na quantidade de oxigénio dissolvido na cerveja.

Por outro lado, a realização do *dry hopping*, resultou na diminuição dos valores de OD, explicável pela introdução de compostos antioxidantes provenientes do lúpulo na cerveja,

nomeadamente polifenóis e flavonoides. Após a carbonatação, essa redução foi ainda mais notória, devendo-se, provavelmente, à maior extensão das reações entre as moléculas de O<sub>2</sub> presentes no produto e os compostos da cerveja, onde se incluíam os compostos antioxidantes provenientes do lúpulo. Contudo, é importante salientar, que uma descida tão acentuada nos valores de oxigénio dissolvido, pode ter sido provocada por alguns erros associados à medição do aparelho. A origem destes erros pode explicar-se, porventura, pela elevada quantidade de bolhas de CO<sub>2</sub> na cerveja que, por sua vez, pode ter interferido com a correta medição dos valores de oxigénio dissolvido no produto.

Por fim, sabendo que a concentração de oxigénio dissolvido na cerveja final não deve exceder os 50 ppb e que quanto menor for a concentração de oxigénio dissolvido na cerveja final, melhor para a estabilidade e envelhecimento do produto, pode concluir-se que a cerveja, neste caso a **Brut IPA 1**, apresentava uma concentração de oxigénio dissolvido superior ao desejável após a etapa de carbonatação mecânica, com um valor entre os 55,0-65,0 ppb.<sup>52</sup>

Tabela 8- Resultados das medições à concentração de oxigénio dissolvido (OD) na cerveja, em ppb, antes e após a realização das etapas de filtração por terras, *dry hopping* e carbonatação.

<b>Data</b>	<b>Etapa</b>	<b>[OD] (ppb)</b>
19/12/2019	Pré-filtração	325-330
20/12/2019	Pós-filtração	870-880
4/3/2020	Pré-Dry hopping	750-760
4/3/2020	Pós-Dry hopping	545-550
5/3/2020	Pré-carbonatação	545-550
6/3/2020	Pós-carbonatação	55,0-65,0

#### 4.2.2. Análise sensorial

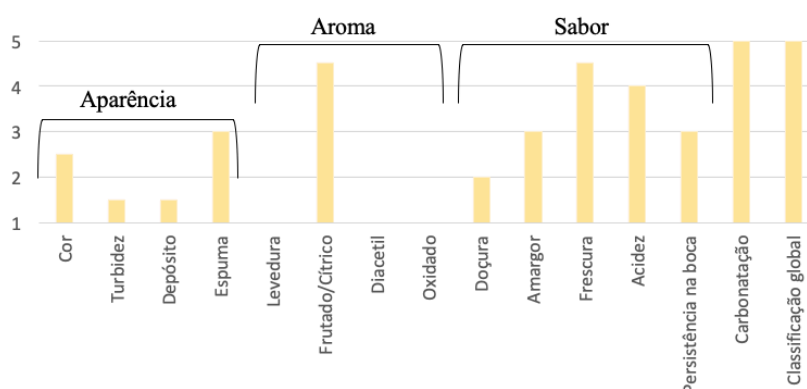
A avaliação sensorial da cerveja desenvolvida, dependia da realização de uma série de provas descritivas, mensalmente, com provadores treinados e semi-treinados, para perceber

o impacto que o envelhecimento dos produtos em garrafa e os diferentes tipos de encapsulamento teriam nas propriedades organoléticas das bebidas.

Para a realização desta análise, houve a necessidade de elaborar uma ficha de prova descritiva (Figura 25 e Figura 26), para que o painel de provadores pudesse avaliar os diferentes produtos em relação a determinados atributos.

A efetuação das análises sensoriais previstas não foi possível, durante o período correspondente a este estágio curricular, como consequência da pandemia mundial causada pelo vírus Covid-19.

No entanto, tendo em conta a prova descritiva, foram definidas as características sensoriais pretendidas para a cerveja *Brut* IPA, possíveis de observar na **Figura 24**.



**Figura 24** – Classificação desejada para as características da cerveja *Brut* IPA, tendo em conta uma escala de 1 a 5, em que 1 representa o nível mínimo e 5 o nível máximo.

Nome do provador: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Código da amostra: \_\_\_\_\_

**Por favor, para cada amostra classifique cada um dos atributos listados abaixo, utilizando a escala correspondente (de 1 a 5), rodeando o valor que mais se adequa na respectiva escala.**

### **Aparência**

#### **Cor**

Clara

Escura

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

#### **Turbidez**

Límpida

Turva

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

#### **Depósito**

Inexistente

Excessivo

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

#### **Espuma**

Ausente

Excessiva

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

### **Aroma**

#### **Levedura**

Nenhum

Pronunciado

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

#### **Frutado**

Nenhum

Forte

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

#### **Diacetil**

Nenhum

Forte

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---

**Figura 25** – Página 1 da possível ficha descritiva a utilizar para as avaliações sensoriais da cerveja desenvolvida.

**Sabor**

**Oxidado**  
 Nenhum Forte

**Doçura**  
 Nenhuma Forte

**Amargor**  
 Leve Acentuado

**Frescura**  
 Nada refrescante Muito refrescante

**Acidez**  
 Nada Ácida Muito Ácida

**Persistência na boca**  
 Nenhuma Forte

**Carbonatação**  
 Insuficiente Excessiva

**Classificação global**  
 Péssima Ótima

Comentários adicionais: \_\_\_\_\_

**Figura 26** – Página 2 da possível ficha descritiva a utilizar para as avaliações sensoriais da cerveja desenvolvida.



### 4.2.3. Análise da composição volátil dos produtos

A avaliação do perfil de compostos voláteis das cervejas desenvolvidas ficou comprometida, durante o período correspondente ao estágio curricular, pelas mesmas razões referidas no ponto anterior.

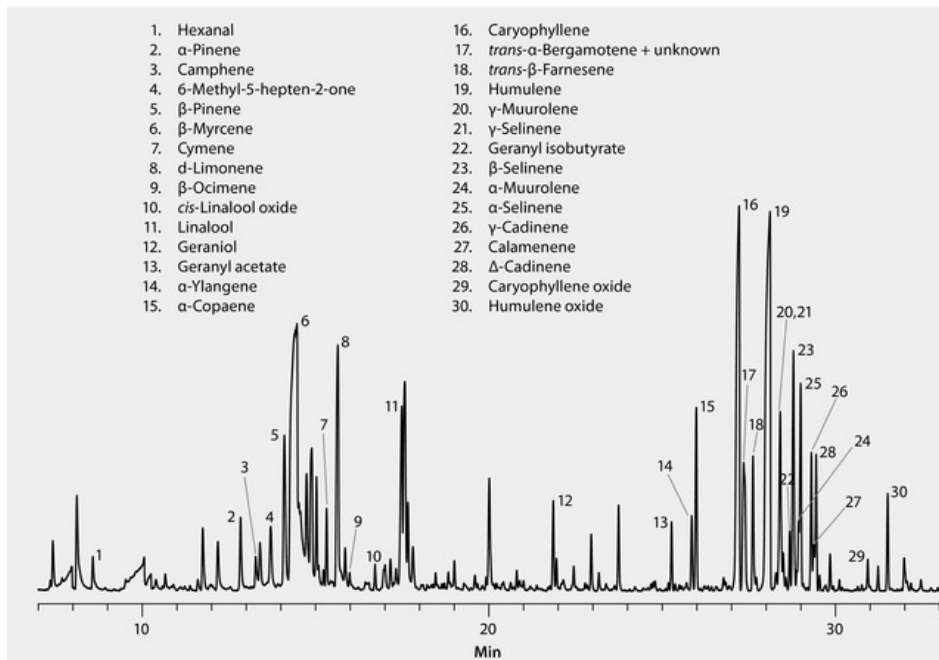
Contudo, sabendo que o lúpulo iria influenciar grandemente a composição volátil da cerveja, devido à presença de compostos aromáticos na sua composição, nomeadamente óleos essenciais, seria previsível a presença desses mesmos compostos na cerveja, tendo em consideração o uso exclusivo do lúpulo *Cascade*, durante os processos de *dry hopping*.

Na Figura 27, verifica-se que o lúpulo da variedade *Cascade*, apresenta um perfil de compostos voláteis bastante extenso, com destaque para os elevadas concentrações do monoterpeno mirceno (6) e dos sesquiterpenos cariofileno (16) e humuleno (19).<sup>53</sup>

Desta forma, é expectável que no cromatograma relativo a uma futura análise da composição volátil da cerveja se identifiquem picos com tempos de retenção coincidentes aos observados na Figura 27.

A observação de diferenças significativas entre a cerveja carbonatada mecanicamente (**Brut IPA 1**) e a cerveja refermentada (**Brut IPA 2**), seria algo igualmente esperado, visto que na última, a segunda fermentação iria dar origem a compostos voláteis que não iriam estar presentes no produto carbonatado através da injeção de CO<sub>2</sub>, nomeadamente ésteres.

Relativamente aos diferentes tipos de encapsulamento, também se deveriam verificar diferenças no perfil aromático dos produtos, no entanto, neste caso seria mais difícil de prever as mesmas. No entanto, considerando protocolos anteriores, entre a empresa Essência D'Alma e a empresa Champcork S.A., foi possível verificar que a utilização das rolhas de cortiça de dois discos (R2D), promovia a obtenção de melhores resultados, a nível da qualidade e de longevidade das cervejas, com a preservação das características aromáticas desejáveis das mesmas durante um período mais longo.



**Figura 27** – Análise por HS-SPME/GC-MS da composição volátil do lúpulo da variedade Cascade, utilizado nos processos de *Dry Hopping* da cerveja. Retirado de (53).

## Conclusões

A realização deste estágio curricular teve dois objetivos centrais, o primeiro visava a aquisição de competências e conhecimentos relacionados com a produção cervejeira, com a compreensão relativamente à importância e ao impacto que as diferentes matérias primas e etapas do fabrico de cerveja teriam no produto final. O segundo objetivo consistia no desenvolvimento de um novo produto, neste caso uma cerveja *Brut IPA*, em contexto microcervejeiro, na empresa Essência D'Alma.

Tendo em conta o primeiro objetivo, o cumprimento do mesmo foi alcançado, através da pesquisa relacionada com a escrita deste relatório de estágio e através da realização e participação nas atividades diárias da empresa. Estas atividades englobaram etapas, como: *Dry Hopping*, filtração, carbonatação e higienização dos equipamentos. Para além disso, foram efetuadas outras atividades, relativas ao controlo do processo cervejeiro, como a análise dos parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba e da medição da viabilidade e concentração celular das leveduras recuperadas.

Quanto ao desenvolvimento da nova cerveja em si, é necessário realçar que as circunstâncias que ocorreram durante este ano letivo, com a pandemia do coronavírus, afetaram grandemente os resultados que se pretendiam obter, nomeadamente para a caracterização sensorial e volátil dos produtos resultantes. Contudo, foram efetuadas várias etapas relativas ao desenvolvimento de novos produtos alimentares (DNPA), nomeadamente a análise do mercado alimentar, com foco no setor cervejeiro artesanal; a triagem de ideias, com a respetiva avaliação da viabilidade da mesma a vários níveis (financeiros, tecnológicos e regulamentares); a obtenção da formulação do produto, com o apoio da cervejaria brasileira Albanos e recorrendo ao software cervejeiro *Beersmith*; e a produção da cerveja em si, que resultou em dois produtos distintos, mais concretamente a cerveja *Brut IPA 1*, carbonatada mecanicamente, e a *Brut IPA 2*, carbonatada via refermentação em garrafa.

Deste modo, foram obtidos alguns resultados relativos às análises físico-químicas aos produtos, com a *Brut IPA 1* a apresentar um pH final de 3,80, teor de sólidos solúveis de 4,70 °Brix e uma concentração de oxigénio dissolvido entre os 55 e os 65 ppb, antes do enchimento. Em relação à *Brut IPA 2*, o pH antes da refermentação encontrava-se nos 3,85, com um teor de sólidos solúveis de 6,80 °Brix. Para além disso, foi possível aferir que a etapa de filtração por terras, teve um impacto enorme na turbidez e na concentração de

oxigénio dissolvido dos produtos finais. Este processo foi responsável pela redução da turbidez da cerveja, que passou de valores de 199 FTU para 6,96 FTU. Contudo, apesar da desejável redução da turbidez da cerveja, a filtração por terras constituiu também um problema no que diz respeito ao aumento da concentração de oxigénio dissolvido na bebida, que passou de 325-330 ppb para 870-880 ppb. No entanto, com a posterior realização das etapas de *dry hopping* e carbonatação mecânica (no caso da *Brut IPA 1*), os valores de oxigénio dissolvido na cerveja sofreram uma diminuição acentuada, passando para concentrações a rondar os 55-65 ppb, ainda um pouco acima do desejável.

Por fim, tendo em conta as condicionantes vivenciadas no decorrer deste trabalho, pode concluir-se que o objetivo principal, que consistia no desenvolvimento de uma nova cerveja *Brut IPA* em contexto microcervejeiro, foi atingido. Tendo em consideração trabalho futuro, este relatório contém informação que pode auxiliar na caracterização volátil e sensorial da cerveja.

## Referências

1. Hornsey, I. S. *History of Beer and Brewing*. (The Royal Society of Chemistry, 2003).
2. Eßlinger, H. M. *Handbook of Brewing*. (Wiley, 2006).
3. Unesco. Beer culture in Belgium. Available at: <https://ich.unesco.org/en/RL/beer-culture-in-belgium-01062>. (Accessed: 28th November 2019)
4. The Brewers of Europe. European Beer Statistics. (2019). Available at: <https://brewersofeurope.org/site/countries/key-facts-figures.php>. (Accessed: 30th December 2019)
5. Willaert, R. The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. in *Handbook of Food Products Manufacturing* 443–506 (Wiley-Interscience, 2007).
6. Martins, C., Brandão, T., Almeida, A. & Rocha, S. M. *Saccharomyces spp.* role in brewing process and its serial repitching impact. in *Food and Beverage Consumption and Health* 213–256 (Nova Publishers, 2016).
7. Kunze, W. *Technology brewing and malting*. (VLB Berlin, 2004).
8. Reich, J. Barley Seed Cross-Section. Available at: <https://jonathanreich.art/barley-seed-final/>. (Accessed: 1st December 2019)
9. Kappler, S., Krahl, M., Geissinger, C., Becker, T. & Krottenthaler, M. Degradation of iso- $\alpha$ -acids during wort boiling. *J. Inst. Brew.* 332–338 (2010).
10. Church, M. Hop Cross Section. (2016). Available at: <https://www.cannonhillbrewing.com.au/hopswest-kraicanup-hop-cross-section/>. (Accessed: 30th November 2019)
11. Karabín, M., Hudcová, T., Jelínek, L. & Dostálek, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 542–567 (2016).
12. Durello, R. S., Silva, L. M. & Bogusz, S. Hop Chemistry. *Quim. Nova* 900–919 (2019).
13. Soares, E. V. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J. Appl. Microbiol.* 1–18 (2011).
14. Kayikci, Ö. & Nielsen, J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* (2015).

15. Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. & Stevens, R. *Brewing Science and practice*. (CRC Press, 2004).
16. Dickenson, C. J. Dimethyl Sulphide - Its Origin and Control in Brewing. *J. Inst. Brew* (1983).
17. Berg J. M. & Tymoczko J. L. Glycolysis is an energy-conversion pathway in many organisms. in *Biochemistry. 5th edition* (W. H. Freeman, 2002).
18. Kucharczyk, K. & Tuszyński, T. Effect of Wort Filling Time on Fermentation, Maturation and Acetaldehyde Content in Beer. *Czech J. Food Sci.* (2016).
19. Liégeois, C., Meurens, N., Badot, C. & Collin, S. Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. *J. Agric. Food Chem.* 7634–7638 (2002).
20. De Keukeleire, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. *Quim. Nov.* 108–112 (2000).
21. Schönberger, C. & Kostelecky, T. 125th anniversary review: The role of hops in brewing. *J. Inst. Brew.* 259–267 (2011).
22. Hieronymus, S. *For the love of hops : the practical guide to aroma, bitterness, and the culture of hops*. *Brewers Publications* (Brewers Publications, 2012).
23. Oladokun, O. *et al.* Dry-Hopping: The effects of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers. *BrewingScience* 187–196 (2017).
24. Sigrist-Photometer AG. Calibration (Turbidity). Available at: <https://www.photometer.com/en/GlossaryEntry/Calibration-turbidity/>. (Accessed: 18th May 2020)
25. Tiantai. Kieselguhr filter. Available at: <http://www.craftbreweryequipment.com/tags.php?/Kieselguhr+filter/>. (Accessed: 2nd May 2020)
26. Hanna Instruments. Instrumentos e testes analíticos. Available at: [https://www.hanna.pt/fichs/ficheiros/doc\\_1\\_20191010110147.pdf](https://www.hanna.pt/fichs/ficheiros/doc_1_20191010110147.pdf). (Accessed: 8th May 2020)
27. White, C. & Zainasheff, J. *Yeast - The practical guide for beer fermentation*. (Brewers Publications, 2010).
28. Kara, B. V., Simpson, W. J. & Hammond, J. R. M. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *J. Inst. Brew.* 153–158 (1988).

29. Aramouni, F. & Deschenes, K. *Methods for developing new food products*. (DEStech Publications, 2015).
30. Wu, J., Chang, C. T., Teng, J. T. & Lai, K. K. Optimal order quantity and selling price over a product life cycle with deterioration rate linked to expiration date. *Int. J. Prod. Econ.* 343–351 (2017).
31. Howard R. Moskowitz, I. Sam Saguy, T. S. *An Integrated Approach to New Food Product Development*. (CRC Press, 2009).
32. Beckley, Jacqueline H., Foley, M. Michele, Herzog, L. J. *Accelerating new food product design and development*. (Wiley, 2017).
33. Fuller, G. W. *New food product development: From concept to marketplace. New Food Product Development: From Concept to Marketplace, Third Edition* (CRC Press, 2016).
34. FoodDrinkEurope. Data & Trends EU Food and Drink Industry. 30 (2019). Available at: [https://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications\\_documents/FoodDrinkEurope\\_-\\_Data\\_\\_Trends\\_2019.pdf](https://www.fooddrinkeurope.eu/uploads/publications_documents/FoodDrinkEurope_-_Data__Trends_2019.pdf). (Accessed: 3rd April 2020)
35. The Brewers of Europe. Portugal, Key figures 2018. (2018). Available at: <https://brewersofeurope.org/uploads/mycms-files/documents/publications/2019/country-profiles/Portugal.pdf>. (Accessed: 3rd April 2020)
36. Sharma, A. Craft Beer Market Size , Share & Trends Analysis Report 2018-2025. *Value Mark. Res.* 1–3 (2019).
37. Bostwick, W. *Brewer's Tale: A History of the World According to Beer*. (W. W. Norton & Company, 2014).
38. Strong, G. & England, K. 2015 Style Guidelines. *Beer Judge Certification Program* 93 (2015). Available at: [https://www.bjcp.org/docs/2015\\_Guidelines\\_Beer.pdf](https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf). (Accessed: 5th April 2020)
39. Hampson, T. *The Beer Book*. (DK, 2008).
40. Andrews, S. *Textbook Of Food & Beverage Management*. (McGraw-Hill, 2008).
41. AB Vichers. Glucoamylase 400 (GAG 511). (2019). Available at: [https://www.lallemandbrewing.com/docs/products/tds/tds\\_abv\\_enzymes\\_glucoamylase-400\\_eng\\_digital.pdf.%0A](https://www.lallemandbrewing.com/docs/products/tds/tds_abv_enzymes_glucoamylase-400_eng_digital.pdf.%0A). (Accessed: 2nd March 2020)
42. FAO. *Codex Alimentarius*: GSFA Online Food Category 14.2.1. Available at:

- <http://www.fao.org/gsfaonline/foods/details.html?id=254&d-3586470-o=2&d-3586470-s=2>. (Accessed: 12th April 2020)
43. Ritchie, H. & Roser, M. Alcohol Consumption - Our World in Data. Available at: <https://ourworldindata.org/alcohol-consumption#all-charts-preview>. (Accessed: 28th April 2020)
  44. Silano, V. *et al.* Safety of the food enzyme glucoamylase from a genetically modified *Aspergillus niger* (strain NZYM-BF). *EFSA J.* (2018).
  45. Novozymes. *Amyloglucosidase from Talaromyces emersonii expressed in Aspergillus niger*. (2016).
  46. HACH. Optical oxygen measurement in power plants. Available at: <https://uk.hach.com/cms-view.jsa?page=/cms/guides/power/power-dissolved-oxygen-en.jsp>. (Accessed: 1st May 2020)
  47. Piggott, J. *Alcoholic beverages: Sensory evaluation and consumer research*. *Alcoholic Beverages: Sensory Evaluation and Consumer Research* (Woodhead Publishing, 2011).
  48. Mottaleb, M. A., Mezirani, M. J. & Islam, M. R. Solid-Phase Microextraction and its Application to Natural Products. in *Encyclopedia of Analytical Chemistry* 1–23 (John Wiley & Sons, Ltd, 2014).
  49. Sparkman, O. D., Penton, Z. & Kitson, F. G. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide* (Elsevier Inc., 2011).
  50. Brew Cabin. The Complete List of Every Malted Barley on Earth. Available at: <https://www.brewcabin.com/malted-barley/>. (Accessed: 7th May 2020)
  51. Loch-Ahring, S., Decker, F., Robbert, S. & Andersson, J. T. Chill-haze- Identification and determination of haze-active constituents by HPLC and mass spectrometry Part I: The role of polyphenols and the astonishing impact of hop components on chill haze formation. *BrewingScience* (2008).
  52. Barnette, B. M. & Shellhammer, T. H. Evaluating the Impact of Dissolved Oxygen and Aging on Dry-Hopped Aroma Stability in Beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 179–187 (2019).
  53. Sigma Aldrich. GC Analysis of Terpenes in Hops (Cascade Variety). Available at: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/analytical-applications/gc/gc-analysis-of-terpenes-in-hops-cascade-variety-g1006620.html>. (Accessed: 26th May 2020)



## Anexos

Anexo 1 – Escala EBC de acordo com o correspondente estilo e cor da cerveja. Adaptado de (50).

	Estilo de cerveja	Cor	EBC
	Pale lager, Witbier, Pilsener, Berliner Weisse		4
	Maibock, Blonde Ale		6
	Weissbier		8
	American Pale Ale, India Pale Ale		12
	Weissbier, Saison		16
	English Bitter, ESB		20
	Biere de Garde, Double IPA		26
	Dark lager, Vienna lager, Marzen, Amber Ale		33
	Brown Ale, Bock, Dunkel, Dunkelweizen		39
	Irish Dry Stout, Doppelbock, Porter		47
	Stout		57
	Foreign Stout, Baltic Porter		69
	Imperial Stout		79