



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2019

**Lídia Marta Marques
Dias**

**Desenvolvimento de uma bebida sem álcool, à base
de malte**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2019

**Lídia Marta Marques
Dias**

**Desenvolvimento de uma bebida sem álcool, à base
de malte**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo em 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 Engenheiro Nicolas Jean-Louis Billard, Sócio-Gerente da Empresa Essência d'Alma, Lda.

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

o júri

presidente

Prof. Doutor José António Teixeira Lopes da Silva
professor auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

arguente

Prof. Doutora Maria Paula do Amaral Alegria Guedes de Pinho
Investigadora Coordenadora da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, e
Professora Associada Convidada com Agregação na Faculdade de Ciências 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

Agradeço aos meus orientadores, Professora Doutora Sílvia M. Rocha e Engenheiro Nicolas Billard, por todo o apoio, acompanhamento, compreensão e partilha de conhecimentos ao longo deste projeto.

Agradeço a todos os colegas da empresa Essência D'Alma Lda., principalmente ao Tiago, ao Daniel, ao Samuel e à Bárbara, pelo espírito de equipa, pela paciência, pela compreensão, pela partilha de conhecimentos e preocupações que ao longo do tempo se foram transformando em verdadeira amizade. Obrigada por todas as conversas, todos os desabafos e todas as gargalhadas em conjunto, obrigada por terem tornado os meus dias mais empolgantes e a rotina menos entediante.

Agradeço ao meu namorado, Afonso, por ter acreditado sempre em mim, pelos sorrisos diários sem mágoa nem rancor, pelas palavras de apoio e conforto, pela sinceridade, por ser ele próprio e por estar sempre para mim.

Agradeço aos meus pais, Isabel e Pedro, por me terem ensinado a lutar pelos meus objetivos, por terem acreditado sempre em mim, por me terem apoiado e encorajado nos momentos mais difíceis, por terem sofrido e lutado comigo e por mim. Obrigada por serem os melhores pais que eu poderia ter.

palavras-chave

Malte, lúpulo, mosto, bebida sem álcool, carboidratos, minerais, energia.

resumo

O estágio curricular, inserido no âmbito desta dissertação de mestrado, foi desenvolvido na Essência D'Alma, Lda, uma microcervejeira localizada em Oliveira de Azeméis, no distrito de Aveiro, que tem sido reconhecida com vários prémios e medalhas, tanto em Portugal como no estrangeiro. Apesar de todos os prémios que tem vindo a conquistar, para conseguir sobreviver e prosperar, a empresa necessita de continuar a inovar, nomeadamente através do desenvolvimento de novos produtos e da sua introdução no mercado. Assim, o principal objetivo do estágio subjacente a esta dissertação consistiu em desenvolver uma nova bebida, sem álcool e à base de malte, com potencial para ser introduzida no mercado.

Após uma análise do setor alimentar em Portugal surgiram várias ideias para o novo produto, sendo selecionada a ideia de uma bebida inovadora, capaz de englobar simultaneamente características de cerveja sem álcool, bebida de reposição hidroeletrólítica e refrigerante. Na fase seguinte, analisou-se o pH e teor de sólidos solúveis de outras bebidas comercialmente disponíveis, com o que se definiu que o novo produto deveria apresentar um pH de 3,00-3,50, que seria apenas ligeiramente superior à média dos refrigerantes (de 3,03), e um teor de sólidos solúveis de 6,00-8,00 °Brix, que seria ligeiramente inferior à média dos refrigerantes (de 9,90 °Brix). Posteriormente, através do desenvolvimento de protótipos de bancada, percebeu-se que a formulação da nova bebida deveria ser constituída por 61 % de mosto da cerveja Vadia Orgânica, 31 % de água adicional, 6 % de sumo de maracujá e 2 % de concentrado de maçã. De seguida, definiu-se o processo de fabrico desse produto, o qual teve por base algumas etapas do processo cervejeiro e terminou com uma pasteurização. A bebida resultante desse processo de fabrico foi então caracterizada por meio de análises sensoriais, físico-químicas e microbiológicas. A avaliação sensorial, tanto por parte dos consumidores como por parte dos provadores semi-treinados foi bastante positiva, indicando agrado pelo produto. Já os resultados das análises físico-químicas mostraram que a nova bebida possui um teor de carboidratos (83 g/L), incluindo glucose (11,4 g/L), que é compatível com os requisitos de um repositivo hidroeletrólítico, enquanto o teor de sódio (28 mg/L) ficou bastante aquém do recomendado para esse tipo de bebidas. Em paralelo, as análises microbiológicas realizadas revelaram que o produto pode ser consumido sem riscos para a saúde pública.

Assim, o produto desenvolvido no âmbito desta dissertação de mestrado, e que foi recentemente introduzido no mercado, consiste numa bebida sem álcool e com sabor a maracujá, denominada *Vadia 100*, que é 100 % vegetal e isenta de conservantes, corantes ou aromas artificiais, estando perfeitamente adaptada a um consumo quotidiano, por indivíduos de ambos os géneros, apesar de se destinar essencialmente a pessoas ativas e descontraídas, que frequentando ambientes também descontraídos.

Em suma, o estágio subjacente a esta dissertação foi extremamente enriquecedor a nível de conhecimentos e competências, tendo permitido desenvolver e lançar um novo produto no mercado.

keywords

Malt, hops, wort, non-alcoholic beverage, carbohydrates, minerals, energy.

abstract

The curricular internship, under this master's dissertation, was developed at the company Essência D'Alma, Lda, a microbrewery located in Oliveira de Azeméis, in the district of Aveiro, which has been recognized with several awards, both in Portugal and abroad. Despite all the awards it has been winning in order to survive and thrive, the company needs to continue to innovate, mainly through the development of new products and their introduction into the market. Thus, the primary objective of the internship underlying this dissertation was to develop a new alcohol-free and wort-based beverage, that could be introduced in the market.

After an analysis of the food sector in Portugal, several ideas emerged for the new product, and the idea of an innovative beverage, capable of simultaneously encompassing a non-alcoholic beer, a hydroelectrolytic replacement drink and a soft drink, was selected.

In the next phase, the pH and soluble solids content of other commercially available beverages were analyzed and, with that, it was defined that the product should have a pH of 3.00-3.50, which would be only slightly higher than the average soft drink (3.03), and a soluble solids content of 6.00-8.00, which would be slightly lower than the average soft drink (of 9.90). Subsequently, through the development of bench prototypes, it was realized that the formulation of the new drink should consist of 61 % of Vadia Orgânica wort, 31 % of additional water, 6 % of passion fruit juice and 2 % of apple concentrate. Then, the manufacturing process of this product was defined, which was based on some stages of the brewing process and ended with a pasteurization. The drink resulting from this manufacturing process was then characterized by sensory, physicochemical and microbiological analysis. The sensory evaluation by both consumers and semi-trained tasters was very positive, indicating a pleasure with the product. The results of the physicochemical analysis showed that the new drink has a carbohydrate content (83 g/L), including glucose (11.4 g/L), which is compatible with the requirements of a hydroelectrolytic replenisher, while the sodium content (28 mg/L) was well below the recommended for this type of drinks. In parallel, the microbiological analysis carried out revealed that the product can be consumed without risk to public health.

Thus, the product developed under this master's dissertation, and which has recently been introduced to the market, consists of a non-alcoholic and passion fruit flavored drink, called *Vadia 100*, which is 100% vegetable and free of preservatives, colorings or artificial flavors. It is perfectly adapted to everyday consumption by individuals of both genders, although it is mainly intended for active and relaxed people, who also attend relaxed environments.

In short, the internship behind this dissertation was extremely enriching in terms of knowledge and skills, enabling the development and launch of a new product into the market.

Índice Geral

Índice de Figuras	i
Introdução.....	1
1. A empresa	1
2. Enquadramento e objetivos do estágio	2
3. Estrutura da dissertação	3
<i>Capítulo I – Processo cervejeiro</i>	4
1. A cerveja.....	4
2. Principais matérias-primas utilizadas no fabrico de cerveja.....	6
2.1. Cereal.....	7
2.2. Lúpulo.....	8
2.3. Leveduras.....	13
3. Principais etapas do processo de fabrico de cerveja	17
3.1. Maltagem	18
3.2. Moagem	23
3.3. Brassagem.....	23
3.4. Filtração do mosto.....	25
3.5. Ebulição	26
3.6. Fermentação.....	29
3.7. Maturação	33
3.8. Filtração da cerveja.....	35
3.9. Carbonatação.....	35
3.10. Enchimento para garrafa	36
3.11. Pasteurização.....	37
<i>Capítulo II – Participação nas atividades diárias da empresa</i>	38
1. Participação nas atividades diárias da empresa	38
1.1. Procedimentos.....	38
1.1.1. Filtração	38
1.1.2. Carbonatação.....	40
1.1.3. Higienização dos materiais e equipamentos	41
1.1.4. Determinação da viabilidade e concentração das leveduras recuperadas	42
1.1.5. Análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba	44
1.2. Resultados e sua interpretação	46
1.2.1. Filtração	46
1.2.2. Carbonatação.....	46

1.2.3.	Determinação da viabilidade e concentração das leveduras recuperadas	47
1.2.4.	Análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba	49
	<i>Capítulo III – Desenvolvimento de um Novo Produto Alimentar</i>	<i>53</i>
1.	A importância dos novos produtos alimentares	53
2.	O processo de desenvolvimento de novos produtos alimentares	55
3.	Desenvolvimento estruturado da nova bebida	58
3.1.	Análise do mercado alimentar em Portugal	58
3.1.1.	Bebidas de reposição hidroeletrólítica	62
3.1.2.	Cervejas sem álcool.....	67
3.2.	Geração de ideias	69
3.3.	Seleção da ideia mais promissora	70
3.4.	Definição do conceito	72
3.5.	Questionário ao público-alvo	74
3.6.	Reformulação da ideia	80
3.7.	Testes de formulação	81
3.8.	Definição do processo	84
4.	Metodologias para caracterização do produto	85
4.1.	Notas introdutórias.....	85
4.1.1.	Avaliação sensorial	85
4.1.2.	Análise físico-química e microbiológica	86
4.2.	Procedimentos.....	87
4.2.1.	Avaliação sensorial	87
4.2.2.	Análise físico-química	93
4.2.3.	Análise microbiológica	97
4.3.	Resultados e sua discussão.....	99
4.3.1.	Avaliação sensorial	99
4.3.2.	Análise físico-química	101
4.3.3.	Análise microbiológica	102
	<i>Capítulo IV – Conclusões</i>	<i>103</i>
	Referências bibliográficas	106

Índice de Figuras

Figura 1: Anatomia de um cone da espécie <i>Humulus lupulus</i> . Adaptado a partir de [9].	9
Figura 2: Estruturas químicas dos principais α -ácidos (A) e β -ácidos (B) do lúpulo.	10
Figura 3: Estruturas químicas dos principais óleos essenciais do lúpulo: (A) monoterpênos, (B) sesquiterpênos e (C) terpenos oxigenados. Adaptado a partir de [10].	12
Figura 4: Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos (A) e prenilflavonóides (B) constituintes dos óleos essenciais do lúpulo. Adaptado a partir de [10].	13
Figura 5: Principal via de repressão pela glucose em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . Retirado de [12].	15
Figura 6: Processo de floculação das leveduras, em que as floculinas das células floculantes se ligam aos resíduos de manoses das células adjacentes. Adaptado a partir de [14].	17
Figura 7: Principais etapas do processo de fabrico de cerveja. Adaptado a partir de [15].	18
Figura 8: Modo de atuação das enzimas α -amilases (AA), β -amilases (BA) e dextrinases-limite (DL), nas cadeias de amilose e amilopectina do amido dos cereais. Adaptado a partir de [16].	20
Figura 9: Principais diferenças entre a produção de mosto com: (A) malte de cevada, (B) uma mistura de malte de cevada e cereais não maltados, e (C) apenas cereais não maltados. Adaptado a partir de [6].	22
Figura 10: Reação de isomerização dos α -ácidos do lúpulo nos correspondentes iso- α -ácidos. Adaptado a partir de [10].	26
Figura 11: Estruturas base de (A) compostos O-heterocíclicos com sabor a caramelo e malte, e (B) compostos N-heterocíclicos com sabor a cereal, pão e nozes. Adaptado a partir de [7].	27
Figura 12: Vias bioquímicas da glicólise e respiração aeróbia (no citoplasma) e da fermentação alcoólica (na mitocôndria). Adaptado a partir de [2].	30
Figura 13: Formação do diacetilo e da 2,3-pentanodiona. Adaptado a partir de [22].	34
Figura 14: Filtros de cartucho utilizados para filtração dos produtos na empresa.	39

Figura 15: Sistema de filtração utilizado na empresa.....	40
Figura 16: Sistema de carbonatação utilizado na empresa.....	41
Figura 17: Vista lateral (A) e frontal (B) da zona de contagem da câmara de Neubauer, estando salientados a laranja os quadrados alvo de contagem ao microscópio ótico. Adaptado a partir de [32].....	43
Figura 18: Análise microscópica de duas amostras de leveduras recuperadas, sujeitas ao mesmo fator de diluição.....	47
Figura 19: Remoção da levedura do mosto, através de uma purga de levedura.....	52
Figura 20: Ciclo de vida típico de um produto no mercado, com as suas quatro fases: 1) Introdução, 2) Crescimento, 3) Maturidade e 4) Declínio. Retirado de [35].	54
Figura 21: Fases do desenvolvimento de um novo produto alimentar. Adaptado a partir de [1].	57
Figura 22: Principais tendências de mercado identificadas a partir da análise do setor alimentar em Portugal, no desenvolvimento estruturado do produto.....	69
Figura 23: Análise gráfica das respostas às questões 1, 2 e 3, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.	76
Figura 24: Análise gráfica das respostas às questões 4 e 5, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.	77
Figura 25: Análise gráfica das respostas às questões 6, 7, 7.1 e 7.2, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.	78
Figura 26: Análise gráfica das respostas às questões 8, 9 e 10, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.	79
Figura 27: Processo de fabrico da bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja e com sabor a maracujá.	85
Figura 28: Página 1 da ficha de prova descritiva aplicada a um painel interno de provadores semi-treinados.	89
Figura 29: Página 2 da ficha de prova descritiva aplicada a um painel interno de provadores semi-treinados.	90

Figura 30: Classificação desejada para os atributos da bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja e com incorporação de sumo de maracujá, numa escala de 1 a 5, em que 1 representa o nível mínimo e 5 representa o nível máximo do respetivo atributo.	91
Figura 31: Ficha de prova qualitativa aplicada aos potenciais consumidores do novo produto.	92
Figura 32: Principais componentes de uma unidade de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC): 1) reservatório de eluente, 2) linha de transferência, 3) bomba, 4) válvula de injeção, 5) coluna cromatográfica, 6) detetor, 7) reservatório para resíduos e 8) sistema de aquisição de dados. Adaptado a partir de [60].	95
Figura 33: Classificação desejada (a verde) e obtida (a laranja), por aplicação da ficha de prova descritiva, para os atributos da bebida sem álcool, à base de mosto e com sumo de maracujá, numa escala de 1 a 5, em que 1 representa o nível mínimo e 5 representa o nível máximo do respetivo atributo.	99
Figura 34: Resultados obtidos com maior frequência por aplicação da ficha de prova qualitativa aos potenciais consumidores do novo produto.	100
Figura 35: Pitch para apresentação da nova bebida, Vadia 100, sem álcool e com sabor a maracujá.	105

Índice de Tabelas

Tabela 1: Propriedades de diferentes cereais e pseudocereais, utilizando o seguinte procedimento de maltagem padrão: 1) Maceração: submerso durante 5h a 14,5 °C, 19h seco, submerso durante 4h a 14,5 °C, 20h seco; 2) Germinação: 6 dias a 15 °C; e 3) Secagem: 16h a 50 °C, 1h a 60 °C, 1h a 60 °C e 5h a 80 °C. Adaptado a partir de [7]...8	
Tabela 2: Principais nutrientes presentes no mosto cervejeiro, e suas usuais concentrações. Adaptado a partir de [20]......28	
Tabela 3: Principais vitaminas e minerais presentes no mosto cervejeiro, e suas usuais concentrações. Adaptado a partir de [20].28	
Tabela 4: Resultados das medições de viabilidade (% de células vivas) e concentração celular (nº de células vivas/ L da suspensão original), efetuadas durante o mês de Abril, às amostras das suspensões de leveduras previamente recuperadas e armazenadas a baixa temperatura. Nota: fd corresponde ao fator de diluição aplicado à amostra da suspensão de leveduras.49	
Tabela 5: Resultados das análises físico-químicas efetuadas à cerveja Vadia Rubi (lager), produzida durante o mês de Março, e respetiva percentagem de atenuação.51	
Tabela 6: Resultados das análises físico-químicas efetuadas à cerveja Vadia Trigo (ale), produzida durante o mês de Março, e respetiva percentagem de atenuação.51	
Tabela 7: Teor de sódio, cloreto, potássio, cálcio e magnésio no suor, e teor máximo recomendado dos mesmos eletrólitos, em bebidas destinadas a consumir durante o exercício físico. Adaptado a partir de [46].65	
Tabela 8: Resumo das funções mais importantes desempenhadas por alguns dos principais eletrólitos perdidos através do suor. Adaptado a partir de [51].66	
Tabela 9: Resultados das análises físico-químicas (pH e teor de sólidos solúveis) efetuadas a várias bebidas sem álcool, comercialmente disponíveis, e ao mosto utilizado para o fabrico da cerveja Vadia Orgânica.....83	

Tabela 10: Ingredientes utilizados nos testes de formulação da bebida sem álcool à base de mosto.....	83
Tabela 11: Parâmetros físico-químicos (e respetivos métodos de análise) utilizados, na cervejaria ou na empresa Silliker Portugal, S.A., para caracterização da nova bebida. HPLC = Cromatografia líquida de elevada resolução.	93
Tabela 12: Parâmetros microbiológicos (e respetivos métodos de análise) utilizados, na empresa Silliker Portugal, S.A., para caracterização da nova bebida. TBX = Tryptone Bile X-glucuronide.	97
Tabela 13: Resultados das análises físico-químicas efetuadas ao produto, na Silliker Portugal, S.A. LQ = Limite de quantificação.	101
Tabela 14: Resultados das análises microbiológicas efetuadas ao produto pela Silliker Portugal, S.A.....	102

Siglas e Abreviaturas

IPAC – Instituto Português de Acreditação

EAA – Espectrofotometria de Absorção Atómica (*Atomic absorption spectrofotometry*)

WHO – Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*)

ISO – Organização Internacional de Normalização (*International Standard Organization*)

EFSA – Autoridade de Segurança Alimentar Europeia (*European Food Safety Authority*)

GC – Cromatografia gasosa (*Gas Chromatography*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta resolução (*High Performance Liquid Chromatography*)

FAN – Compostos azotados livres (*Free amino nitrogen*)

TBX – Tryptone Bile X-glucuronide

THC – Tetrahydrocannabinol

ATP – Adenosina trifosfato

NRE – Extremidade não redutora

RE – Extremidade redutora

UP's – Unidades de pasteurização

DMS – Sulfureto de dimetilo

DMSO – Sulfóxido de dimetilo

Acetil-CoA – Acetil-coenzima A

CIP – Limpeza no local (*Clean in place*)

PET – Polietileno tereftalato (*Polyethylene terephthalate*)

EBC - *European Brewery Convention*

ASBC - *American Society of Brewing Chemists*

FTU – *Formazine Turbidity Unit*

UE – União Europeia

UFC – Unidades formadoras de colónias

DNPA – Desenvolvimento de novos produtos alimentares

THC – Tetrahydrocannabinol

Introdução

A parte introdutória desta dissertação começará com uma breve apresentação da empresa na qual foi realizado o estágio subjacente à mesma. De seguida serão apresentados os objetivos do mesmo estágio e ainda a forma como se encontra organizada a presente dissertação.

1. A empresa

O estágio curricular inserido no âmbito desta dissertação de mestrado foi desenvolvido na empresa Essência d'Alma, Lda, uma microcervejeira artesanal sediada em Oliveira de Azeméis, no distrito de Aveiro, detentora da marca Vadia e pioneira no mercado da cerveja artesanal em Portugal. A empresa foi fundada em Outubro de 2010 e desde a sua entrada no mercado, em Janeiro de 2012, tem participado nos mais prestigiados concursos internacionais de cerveja como forma de aferir a qualidade dos seus produtos. Desta forma, a empresa já conseguiu conquistar pelo menos um total de 19 prémios, os quais fazem da Vadia uma das marcas de cerveja artesanal mais premiadas e reconhecidas do país, além de demonstrarem que o nível de qualidade dos seus produtos está em constante crescimento, competindo em qualidade com as cervejas produzidas em países de renome neste setor.

Devido ao crescimento anual que tem apresentado desde a sua entrada no mercado, abrangendo todo o território nacional bem como alguns mercados de exportação, em 2015 a empresa viu-se obrigada a adquirir novos equipamentos e a abrir novas instalações, passando assim de uma área de 250 m² para uma área de 1000 m², os quais incluem a fábrica destinada à produção da cerveja, um *brewpub*, uma sala adaptada para concertos ao vivo e ainda um espaço para eventos e reuniões.

Atualmente a fábrica encontra-se equipada com uma panela de brassagem que serve também como panela de fervura, uma panela de filtração, um tanque para armazenamento do mosto filtrado antes deste ser fervido e um Whirlpool, tudo com capacidade de 1000 L. Além disso, a fábrica dispõe de um moinho de pedra, um permutador de placas para arrefecimento do mosto, um tanque para propagação de leveduras, nove cubas interiores (que perfazem uma capacidade total de 14000 L) destinadas à fermentação e maturação das cervejas, e três maturadores exteriores (que perfazem uma capacidade total de 15000 L). A fábrica também possui duas máquinas enchedoras (uma para garrafas de vidro e outra para barris de inox), duas máquinas capsuladoras de garrafas (uma para caricas de metal e outra para rolhas de cortiça

que são utilizadas em edições especiais limitadas), um pasteurizador de túnel, uma rotuladora e uma máquina para lavagem automática dos barris.

As cervejas da marca Vadia podem ser comercializadas frescas ou pasteurizadas, em garrafas de 33, 50 ou 75 cL ou ainda em barris de 20, 30 ou 50 L. Além das quatro variedades de cerveja pertencentes à gama original (Vadia Loira, Vadia Trigo, Vadia Preta e Vadia Rubi) e das cinco variedades pertencentes à gama de harmonização (Vadia Ginja, Vadia Extra, Vadia Orgânica, Vadia Thartaruga e Vadia Nautika), atualmente a marca conta ainda com a gama Sidra (Vadia Maçã e Vadia Pêra), com três edições especiais limitadas (Portuguese Grape Lager, Ginja Oak Aged Sour e Oak Aged Doppelbock) e também várias cervejas de autor. Existem ainda outras variedades de cerveja do estilo *sour* que são vendidas esporadicamente apenas no *brewpub* da empresa ou em feiras e festivais. De destacar ainda que os produtos da marca Vadia têm uma forte distribuição nacional no canal HORECA, nas grandes superfícies de distribuição, em canais de venda online e também através da venda direta ao consumidor final (no *brewpub* e em eventos como feiras e festivais).

2. Enquadramento e objetivos do estágio

Apesar do crescimento anual que tem apresentado, com um número cada vez maior de medalhas conquistadas e uma distribuição cada vez mais abrangente dos seus produtos, esta microcervejeira enfrenta uma dificuldade que é comum a outras empresas, nomeadamente da área alimentar. Para conseguirem sobreviver e prosperar num mercado altamente competitivo como o que se verifica atualmente, as empresas da área alimentar devem manter-se tão inovadoras quanto possível, desenvolvendo novos produtos e/ou descobrindo novos usos para os seus antigos produtos. Se forem bem-sucedidos quando introduzidos no mercado, esses novos produtos permitirão manter ou até mesmo aumentar o lucro das empresas, substituindo os produtos antigos que já não vendem bem [1, 2]. Contudo, nem sempre isso acontece, pois a taxa de produtos mal-sucedidos, que é definida como um produto que deixa de estar nas prateleiras após cinco anos, pode chegar a 90 % em algumas categorias de supermercado [3]. Por este motivo, o desenvolvimento de novos produtos com potencial de sucesso no mercado requer tempo e dinheiro, mas também instalações físicas adequadas e pesquisa extensa [1].

É a partir da necessidade de se desenvolver um novo produto com potencial de sucesso no mercado que surge o tema da presente dissertação, tendo como principal objetivo o desenvolvimento de uma nova bebida sem álcool e à base de malte. Além deste, outros dois objetivos do mesmo estágio consistiram em, por um lado, adquirir conhecimentos e competências ao nível da produção cervejeira e, por outro lado, contactar com aquilo que é a

realidade de uma empresa, preparando-me melhor para o mundo do trabalho, através da participação nas atividades diárias da empresa, diretamente relacionadas ou não com o processo cervejeiro.

3. Estrutura da dissertação

A presente dissertação encontra-se dividida em quatro capítulos, tendo em conta os diferentes objetivos do estágio. Assim, no primeiro capítulo, intitulado de *Processo cervejeiro*, serão abordados aspetos relativos aos principais ingredientes bem como às principais etapas do processo de fabrico de cerveja. No capítulo seguinte, intitulado de *Participação em atividades diárias da empresa*, serão referidas algumas das atividades diárias da empresa nas quais participei com maior regularidade, com especial enfoque em duas delas que são a análise dos produtos em cuba durante a fermentação e a medição da viabilidade e concentração celular das leveduras recuperadas. No terceiro capítulo desta dissertação, intitulado de *Desenvolvimento de um novo produto alimentar*, serão abordadas as principais etapas do processo geral de desenvolvimento de novos produtos, seguindo-se uma descrição do desenvolvimento estruturado da nova bebida, bem como algumas metodologias utilizadas para caracterizar a mesma. Por fim, no quarto e último capítulo desta dissertação encontram-se as principais conclusões.

Capítulo I – Processo cervejeiro

1. A cerveja

De acordo com a maior parte da literatura atualmente disponível, as bebidas alcoólicas parecem ter sido originadas na pré-história. Sendo isso verdade, elas deverão ter sido descobertas como resultado de um acaso e por vários grupos independentes de povos nômadas. Muito provavelmente, após a ingestão das primeiras bebidas alcoólicas obtidas por acaso, o prazer e a euforia sentidos, bem como o desejo por mais, devem ter levado esses povos a esforçarem-se para garantir a existência regular das matérias-primas necessárias à obtenção de mais bebidas com o mesmo efeito [4]. De acordo com Richard Rudgeley (1993), conforme citado por Hornsey (2003), essa tentativa de produzir bebidas alcoólicas terá sucedido na época do paleolítico, quando o homem dispunha de mais tempo livre para procurar formas de obter prazer. Segundo Joffe (1998), a descoberta de como produzir bebidas alcoólicas, não só terá sido anterior ao sedentarismo, como terá conduzido ao mesmo. Contudo, conforme citado por Hornsey (2003), “tendo em conta o conhecimento atual, é mais provável que a capacidade para produzir bebidas alcoólicas como cerveja, vinho e hidromel, tenha sido uma consequência da tradição agrícola (ou talvez hortícola), e não tenha evoluído até a humanidade deixar de ser composta por povos nômadas caçadores-coletores“ [4].

Joffe (1998) argumentou também que a produção e o consumo de bebidas alcoólicas desempenharam um papel socio-económico importante no desenvolvimento do homem primitivo, levando ao aparecimento de sociedades hierarquicamente organizadas. Devido à provável dificuldade em obter essas bebidas resultantes de fermentação alcoólica, tais produtos deveriam estar reservados a figuras importantes da sociedade e/ou a ocasiões especiais [4].

Atualmente as bebidas alcoólicas apresentam teores de etanol muito mais elevados que na antiguidade e, sendo o etanol mais calórico (com um valor calórico de 7,1 kcal/g) que os carboidratos (com um valor calórico de 4,1 kcal/g), os indivíduos que ingerem regularmente bebidas alcoólicas podem adquirir 2-10 % das suas calorias a partir do etanol, e esse valor pode chegar a 50 % no caso dos indivíduos alcoólatras [4].

Outra característica do etanol é que ele pode ser classificado como hormético, pelo facto de ser benéfico em baixas concentrações, mas tóxico para concentrações mais elevadas. De acordo com Dudley (2000), esse efeito reflete a exposição e a adaptação evolutivas ao álcool. Esse autor defende a existência de uma ligação histórica entre o consumo de álcool por humanos e a frugivoria dos nossos ancestrais primatas. Segundo ele “... a localização de frutas maduras através do olfato de álcoois volatilizados, o uso de álcool como estimulante do apetite

e o consumo de frutas com um teor significativo de etanol, caracterizam potencialmente todos os primatas frugívoros, incluindo a linhagem que leva ao homem moderno... " [5]. De facto, diferentes animais, incluindo mamíferos, aves e insetos (como a mosca da fruta, *Drosophila*), usam o etanol para localizar frutas maduras, pois associam a presença desse composto a uma recompensa nutricional [4].

Em termos biológicos, é desfavorável para as plantas que as suas sementes sejam disseminadas antes de atingirem a maturidade, pois isso dificultaria a reprodução dessas espécies vegetais. Como tal, as plantas desenvolveram mecanismos que, por um lado, evitam o interesse dos animais dispersantes antes do amadurecimento ser atingido e, por outro lado, após a maturidade atraem esses mesmos animais até às suas estruturas reprodutoras, a fim de polinizar flores ou dispersar sementes [5]. O amadurecimento dos frutos é um processo bioquímico complexo que envolve a produção de compostos voláteis, a ocorrência de alterações na cor e textura, e ainda a conversão do amido em açúcares, cujo teor pode atingir 60 % da massa desses frutos (apesar de ser tipicamente de 5-15 %), e isso representa uma quantidade significativa, tanto de calorias para os frugívoros como de substrato para a fermentação por microorganismos [4]. Assim, com o amadurecimento dos frutos e o relaxamento dos mecanismos de defesa das plantas, inicia-se uma corrida entre os animais frugívoros e os microorganismos, para obtenção de energia. A fermentação dos açúcares dos frutos maduros por parte dos microorganismos, principalmente leveduras, pode ocorrer mesmo na presença de oxigénio e dá origem a uma variedade de álcoois, sendo o etanol o predominante [4, 5]. Assim, os animais que ingeriam frutas maduras como uma parte importante da sua dieta, podiam acabar por também ingerir quantidades significativas de etanol. Uma vez que, no início da história, a ingestão dessas frutas maduras contendo baixos teores de etanol era nutricionalmente benéfica para os animais frugívoros, ao longo do tempo foi ocorrendo uma adaptação à ingestão dessas baixas concentrações de etanol, no sentido de maximizar os benefícios fisiológicos e de minimizam os custos associados à sua ingestão [4]. Desta forma, a associação entre o consumo de álcool por humanos e a frugivoria dos nossos ancestrais, como defendido por Dudley (2000), é facilmente compreendida.

Em suma, como referido por Hornsey (2003), o aparecimento de frutas e cereais intencionalmente fermentados parece ser coincidente com o aparecimento do *Homo sapiens*, mas a exposição a teores de etanol ainda mais elevados que os obtidos apenas por fermentação (como acontece nas bebidas destiladas) é ainda mais recente na história dos humanos [4].

Além da questão “Quando terão sido descobertas as bebidas fermentadas e o modo como produzir essas bebidas?”, outra questão importante é “Onde tudo começou?”. As fontes de açúcares que estavam disponíveis para a fermentação na época anterior ao neolítico estariam

limitadas a uvas e frutos silvestres, seiva de árvores, mel e, eventualmente, leite de animais, fornecendo um espectro de açúcares composto essencialmente por sacarose, glucose, frutose e possivelmente lactose. Em climas quentes, essas matérias-primas seriam relativamente abundantes, mesmo antes do advento da prática agrícola, mas em zonas temperadas todas elas seriam escassas, à exceção do mel. Assim, pelo menos em grande parte da Europa, o mel constitui o ingrediente mais provável a partir do qual terá surgido a primeira bebida fermentada, sendo esta algum tipo de hidromel. Em locais mais para o sul da Europa e para o Mediterrâneo oriental, a seiva e os frutos de árvores como a tamareira (*Phoenix dactylifera*), que foi uma das primeiras árvores frutíferas a ser cultivada, constituem os meios mais prováveis a partir dos quais as primeiras bebidas alcoólicas terão sido produzidas. Tanto a seiva como os frutos da tamareira constituem uma das fontes mais abundantes de açúcares (60-70 %) conhecidas no planeta. Em zonas mais temperadas, no início da Primavera, algumas espécies de árvores poderiam produzir cerca de 20-30 L de seiva por dia (com um teor de açúcares de 2-8 % e ainda vitaminas e minerais), alguma da qual seria armazenada até ao Verão, tornando quase inevitável que parte dela não acabasse por fermentar acidentalmente [4].

Mais tarde, com o cultivo de cereais (especialmente cevada e trigo) e a descoberta de que os grãos parcialmente germinados eram muito mais atraentes em termos gastronómicos que os correspondentes grãos crus, outro açúcar fermentável, a maltose, passou a estar disponível para a produção de bebidas alcoólicas. Mais recentemente ainda, com a proliferação dos animais domésticos, também o leite passou a estar regularmente disponível para a produção mais sistemática de bebidas fermentadas como o koumiss¹ [4].

Na atualidade, tanto as principais matérias-primas como as principais etapas do processo de fabrico de cerveja se encontram bem definidas e caracterizadas. Assim, uma breve descrição das mesmas será apresentada nos pontos seguintes deste capítulo.

2. Principais matérias-primas utilizadas no fabrico de cerveja

De acordo com o decreto Bávaro de 1516, posteriormente apelidado de Reinheitsgebot e ainda aplicável na Alemanha, a água, os cereais maltados e o lúpulo são as únicas matérias-primas permitidas para a produção de cerveja, além das leveduras do género *Saccharomyces*. Contudo, noutros sítios do mundo, essa lista de ingredientes pode ser alterada, dependendo da

¹ Koumiss ou kumis é uma bebida tradicionalmente produzida a partir de leite de égua, que é fermentado por bactérias de ácido láctico e leveduras. É muito popular na Ásia central, partes da Rússia e Europa Oriental.

legislação local bem como das preferências dos consumidores e dos objetivos dos fabricantes [6]. Ainda assim, atualmente a cerveja continua a ser produzida principalmente a partir água, cereais maltados e lúpulo, sob a ação de leveduras do género *Saccharomyces*.

2.1. Cereal

O cereal mais amplamente utilizado na produção de cerveja é a cevada, uma gramínea (monocotiledónea) da espécie *Hordeum vulgare* pertencente à família das Poaceae [6]. Em termos culturais e históricos, a cevada pertence às variedades de grãos que os seres humanos cultivaram pela primeira vez na Europa e na Ásia, e é um dos cereais mais omnipresentes no mundo, sendo a Rússia, o Canadá e os países europeus os seus maiores produtores [7]. No que diz respeito aos grãos deste cereal, eles são essencialmente constituídos por uma casca externa, um pericarpo (parede do fruto), um embrião, um grande endosperma amiláceo e um escutelo (cotilédone modificado) que separa o embrião do endosperma [6]. O endosperma compõe cerca de 75 % do peso de um grão, está delimitado por uma camada de lípidos e proteínas e no seu interior contém grânulos de amido embebidos numa matriz proteica. Quanto ao amido, este trata-se de um polissacarídeo composto por 20-25 % de amilose e 75-80 % de amilopectina, sendo a amilose uma longa cadeia linear de resíduos de glucose unidos por ligações α -(1,4), e a amilopectina uma cadeia semelhante mas mais curta e com várias ligações α -(1,6) a introduzir ramificações [6, 8]. Assim, é no endosperma dos grãos de cevada que se encontram as reservas de nutrientes que, após hidrólise enzimática, poderão ser utilizadas para a nutrição e crescimento das leveduras durante a fermentação do mosto [6].

Apesar da cevada (na forma maltada) continuar a ser a principal fonte de nutrientes para as leveduras responsáveis pela fermentação dos açúcares do mosto, em muitos locais do mundo a indústria cervejeira tem vindo a substituir parcialmente esse cereal por outras fontes amiláceas, sendo as mais comuns o arroz e o milho. Os principais motivos para a utilização de outros cereais que não a cevada são: o preço mais favorável de outros cereais, a maior disponibilidade de outros cereais em regiões menos adequadas à produção de cevada, e a tentativa de se produzirem cervejas com características inovadoras que vão ao encontro daquilo que os consumidores procuram (por exemplo sem glúten ou com cores, aromas ou teores proteicos diferentes dos habituais) [7]. Contudo, a utilização de cereais diferentes da cevada pode dificultar o processo de fabrico da cerveja, principalmente pelo baixo teor de amido e de enzimas hidrolíticas que a maioria dessas alternativas contém. Além disso, a aplicação de outros cereais em conjunto com a cevada maltada pode implicar um pré-tratamento dos primeiros antes da brassagem para gelatinizar os seus amidos - processo em que os grânulos de amido se dissolvem em água, transformando-se numa mistura viscosa de polímeros em solução

e tornando-se mais acessíveis à ação das enzimas hidrolíticas durante a brassagem. Esta pré-gelatinização pode ser necessária pelo facto de cereais como o sorgo, o milho e o arroz possuírem temperaturas de gelatinização superiores à cevada, as quais inativariam as enzimas hidrolíticas do malte durante a brassagem. Sendo a cevada o cereal que possui um maior teor de enzimas hidrolíticas, bem como um maior teor de amido (e com uma temperatura de gelatinização mais baixa, que não implica um passo separado da brassagem para promover a gelatinização do mesmo), e ainda uma casca mais capaz de permanecer nos grãos até à fase de filtração atuando assim como um filtro natural, a cevada continua a ser o cereal mais amplamente empregue na produção cervejeira [6]. Uma compilação das propriedades de diferentes cereais e pseudocereais maltados sob condições padrão encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Propriedades de diferentes cereais e pseudocereais, utilizando o seguinte procedimento de maltagem padrão: 1) Maceração: submerso durante 5h a 14,5 °C, 19h seco, submerso durante 4h a 14,5 °C, 20h seco; 2) Germinação: 6 dias a 15 °C; e 3) Secagem: 16h a 50 °C, 1h a 60 °C, 1h a 60 °C e 5h a 80 °C. Adaptado a partir de [7].

Propriedade	Cevada	Arroz	Sorgo	Milho	Amaranto	Quinoa	Aveia
Cor (EBC)	2,9	7,7	7,5	3,2	5,6	5,0	3,7
Proteína (% base seca)	10,5	10,4	7,8	12,1	15,2	13,7	12,6
Compostos azotados livres - FAN (mg/100 g de matéria seca)	140	121	119	110	187	206	145
Atividade da α -amilase (ASBC)	55	18	8	20	1	2	24

2.2. Lúpulo

O lúpulo utilizado no fabrico de cerveja consiste nas flores femininas (também denominadas cones), secas e não fertilizadas, das plantas da espécie *Humulus lupulus* pertencente à família das Cannabaceae, à qual também pertencem os géneros *Cannabis* (muito conhecido pela produção de tetrahydrocannabinol (THC)) e *Celtis* [9]. Além de *H. lupulus*, o género *Humulus* conta com outras duas espécies (*H. japonicus* e *H. yunnanensis*), mas apenas a primeira tem importância industrial [10]. Do ponto de vista botânico, acredita-se que *H. lupulus* seja originária da China, por este ser o único país do mundo onde as três espécies do

mesmo género são naturalmente encontradas. *H. lupulus* é composta por plantas perenes e dioicas, sendo que para a produção cervejeira só são utilizadas as flores das plantas femininas por serem essas que contêm as glândulas produtoras de lupulina (Figura 1). A lupulina consiste num pó amarelo que é rico nas resinas e óleos essenciais que contribuem para o amargor e aroma característicos da cerveja, mas também em compostos polifenólicos e outros constituintes biologicamente ativos que contribuem para a estabilidade química da espuma e do produto final, aumentando assim o prazo de validade do mesmo, além de possuírem propriedades benéficas para a saúde humana [9, 10].

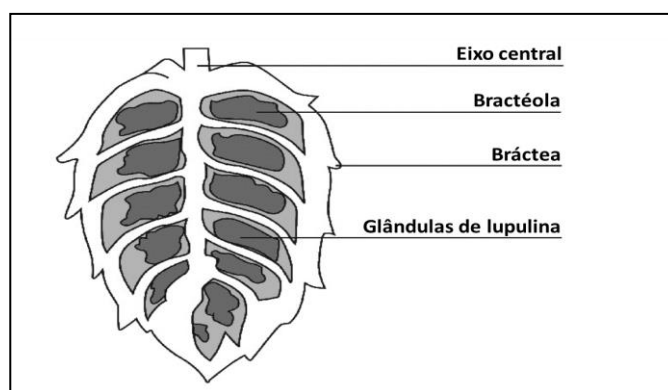


Figura 1: Anatomia de um cone da espécie *Humulus lupulus*. Adaptado a partir de [9].

As resinas mais importantes incluem os α -ácidos ou humulonas (2-17 % do peso seco dos cones) e os β -ácidos ou lupulonas (2-10 % do peso seco dos cones). Os α -ácidos são uma mistura de seis análogos de humulonas (Figura 2A) que podem ser encontrados em todas as variedades de lúpulo, sendo os principais a humulona (35-70 % do total de α -ácidos), a cohumulona (20-55 %) e a adhumulona (10-15%); os outros três menos abundantes são a poshumulona, a prehumulona e adprehumulone. Por sua vez, os β -ácidos consistem em vários análogos de lupulonas (Figura 2B), sendo eles a lupulona (30-55 % do total de β -ácidos), a colupulona (20-55 %), a adlupulona (5-10 %), a prelupulona e a poslupulona [10].

Tais α -ácidos e β -ácidos sofrem uma reação de isomerização, transformando-se assim nos correspondentes iso- α -ácidos e iso- β -ácidos mais solúveis, que são os responsáveis pelo amargor característico do produto final [9]. Sendo esta reação mais favorável para valores mais elevados de temperatura (100-130 °C) e pH (8-10), no fabrico de cerveja ela ocorre durante a fervura do mosto ao qual já foi adicionado o lúpulo, mas não com muita eficiência. De acordo com Bamforth (2000), um máximo de 50 % dos α -ácidos são convertidos em iso- α -ácidos [10]. Além disso os β -ácidos são praticamente insolúveis em água, o que faz com que sejam maioritariamente perdidos durante a fervura do mosto, e por isso a sua importância em termos

de amargor é ainda menor que a dos α -ácidos, destacando-se mais pelas suas propriedades antimicrobianas e capacidade de atuar como conservante natural [9-11].

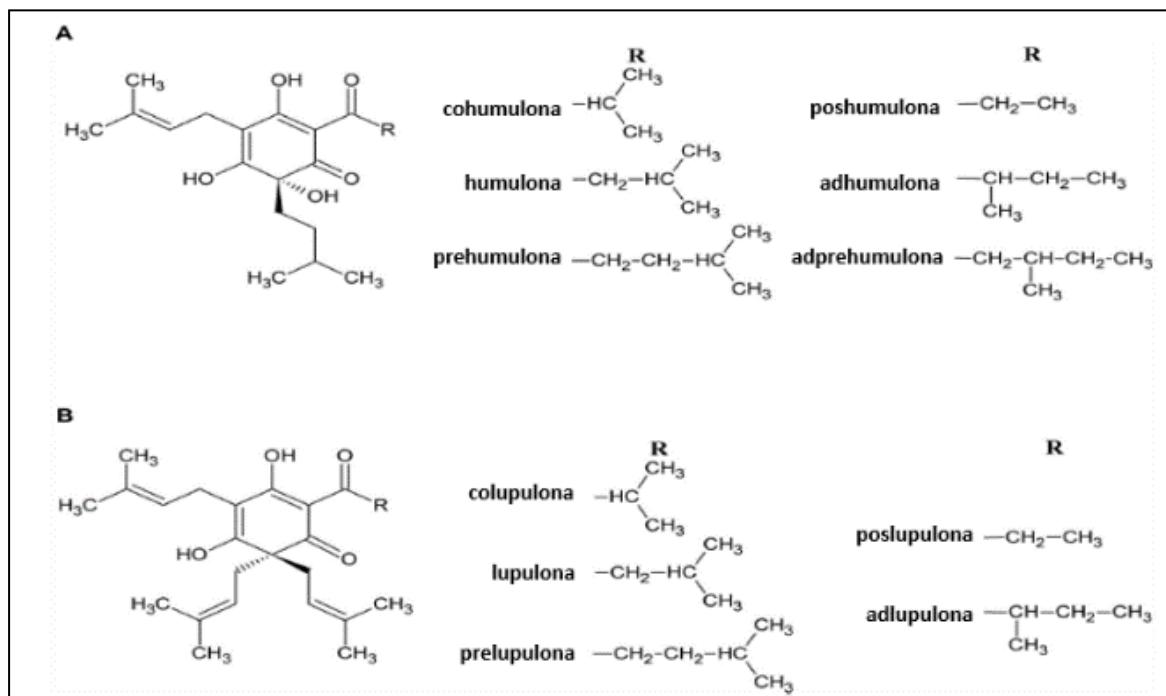


Figura 2: Estruturas químicas dos principais α -ácidos (A) e β -ácidos (B) do lúpulo. Adaptado a partir de [10].

Quanto aos óleos essenciais (0,5-3 % do peso seco dos cones), estes incluem várias centenas de compostos voláteis, com diferentes propriedades biológicas, físico-químicas e organolépticas, que são considerados essenciais por conferirem ao lúpulo o seu aroma característico [9]. Atualmente estes compostos são repartidos por três grandes grupos: os hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos e hidrocarbonetos alifáticos), os compostos oxigenados (álcoois, aldeídos, ácidos, cetonas, epóxidos e ésteres) e os compostos contendo enxofre (tioesteres e outros) [9, 10]. Dentro do grupo dos hidrocarbonetos, os compostos mais abundantes são os monoterpenos α - e β -pineno, mirceno e limoneno (Figura 3A), além dos sesquiterpenos α -humuleno, β -cariofileno, β -farneseno, α - e β -selineno e γ -muroleno (Figura 3B). Já dentro do grupo dos compostos oxigenados, os mais estudados são o linalol, geraniol, óxido de cariofileno e farnesol (Figura 3C). Por sua vez, a fração contendo enxofre representa uma minoria do teor total de óleos essenciais (até 1 %), apesar do seu baixo limiar de odor [10]. No seu todo, os óleos essenciais são um dos grandes responsáveis pelo aroma que é tipicamente sentido no produto final, mas eles são extremamente voláteis e, por esse motivo, o lúpulo que é adicionado no início da fervura acaba por perdê-los quase na totalidade, contribuindo mais para o amargor da cerveja que para o seu aroma. Para que a maioria dos

óleos essenciais persistam e o aroma que eles conferem seja mais notório, podem ser utilizados lúpulos mais aromáticos e/ou pode ser acrescentada uma quantidade adicional de lúpulo ao mosto nos últimos minutos da sua fervura (processo conhecido por *late-hopping*) ou mesmo durante a fermentação ou diretamente no barril (processo conhecido por *dry-hopping*) [11].

Relativamente aos compostos polifenólicos do lúpulo (3-6 % do peso seco dos cones), estes dizem respeito a um grupo de metabolitos secundários biologicamente ativos maioritariamente localizados no eixo central e nas brácteas dos cones, à exceção dos prenilflavonóides que são secretados pelas glândulas de lupulina juntamente com as resinas e os óleos essenciais [10]. Estes compostos podem ser divididos em quatro grandes grupos que são os flavonóis (maioritariamente presentes na forma de glicosídeos), os flavan-3-óis (como as catequinas, epicatequinas e galocatequinas), os ácidos fenolcarboxílicos (como o cafeico, o ferúlico, o gálico, o vanílico, o sináptico, o p-cumárico e o 4-hidroxibenzoico) (Figura 4A) e outros compostos fenólicos (como os prenilflavonóides). Os prenilflavonóides, nomeadamente o xantohumulol, o isoxantohumulol, o desmetilxantohumulol e a 6- e 8-prenilnaringenina (Figura 4B), são compostos que exibem fortes atividades biológicas e que têm demonstrado possuir efeitos protetores e promotores da saúde humana [9, 10].

Por exemplo o xantohumulol tem sido implicado numa série de propriedades terapêuticas, desde o tratamento da osteoporose e aterosclerose até à inibição do HIV-1, além de ter sido caracterizado como um agente quimiopreventivo do cancro de amplo espectro e de ser capaz de atuar contra vários vírus e bactérias Gram positivas [9, 11].

Na produção cervejeira tradicional, o lúpulo é adicionado ao mosto na forma de cones inteiros, o que permite que esse material vegetal forme um leito filtrante semelhante às cascas dos grãos de cevada. Contudo, muitas cervejarias modernas já optam por utilizar produtos de lúpulo processados, como é o caso dos pellets de lúpulo moído e dos extratos de lúpulo líquido [11]. Em comparação com os cones, os produtos de lúpulo processados apresentam algumas vantagens: ocupam um menor volume, simplificando tanto o transporte como o armazenamento desses produtos e reduzindo a quantidade de materiais de embalagem necessários; um lote desses produtos possui uma distribuição mais homogênea dos α -ácidos, possibilitando uma dosagem exata do lúpulo na cervejaria; são protegidos por embalagens especiais contra a oxidação, o que permite preservar a sua qualidade durante mais tempo [7]. Por outro lado, esses produtos processados não formam um leito filtrante natural [7, 11].

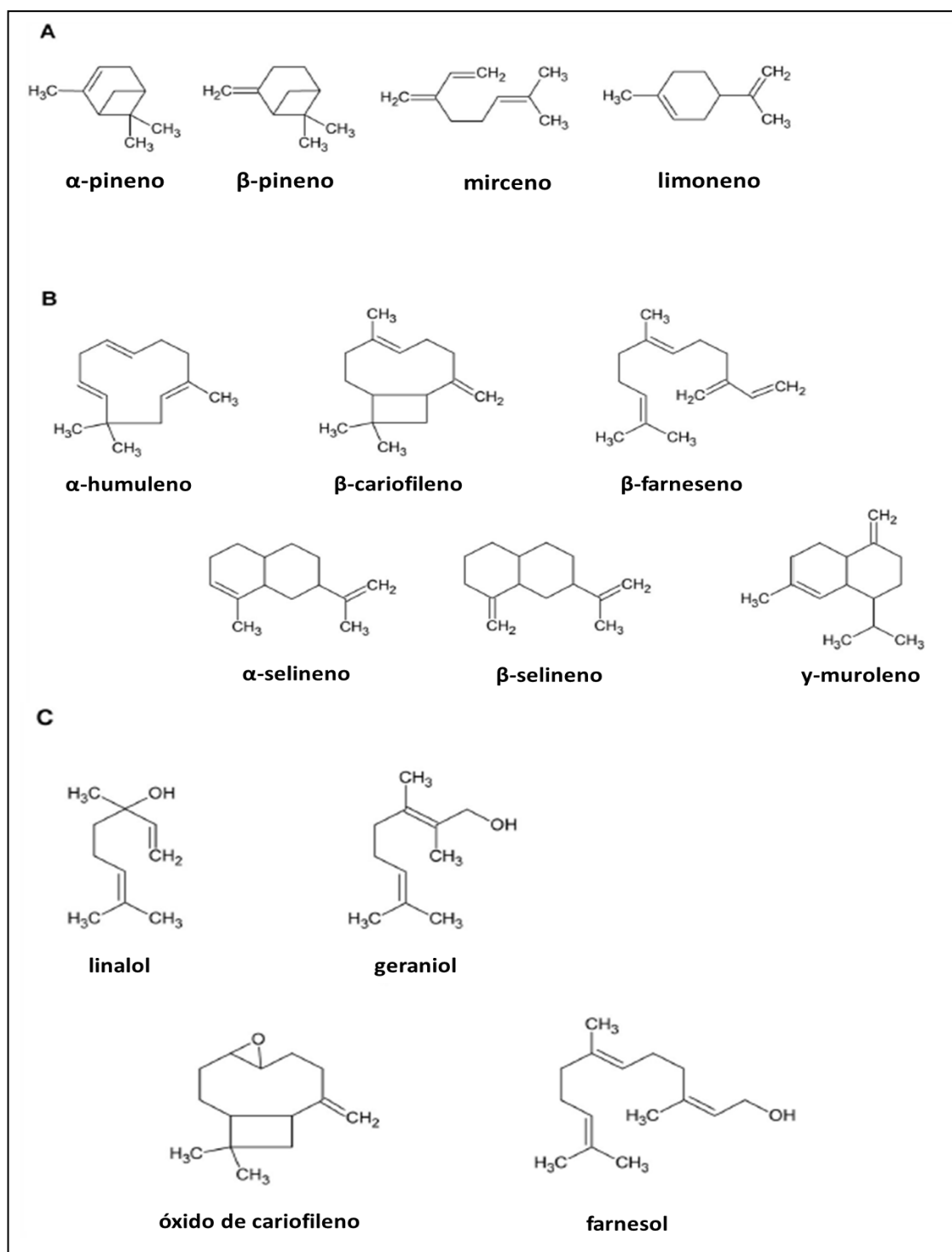


Figura 3: Estruturas químicas dos principais óleos essenciais do lúpulo: (A) monoterpenos, (B) sesquiterpenos e (C) terpenos oxigenados. Adaptado a partir de [10].

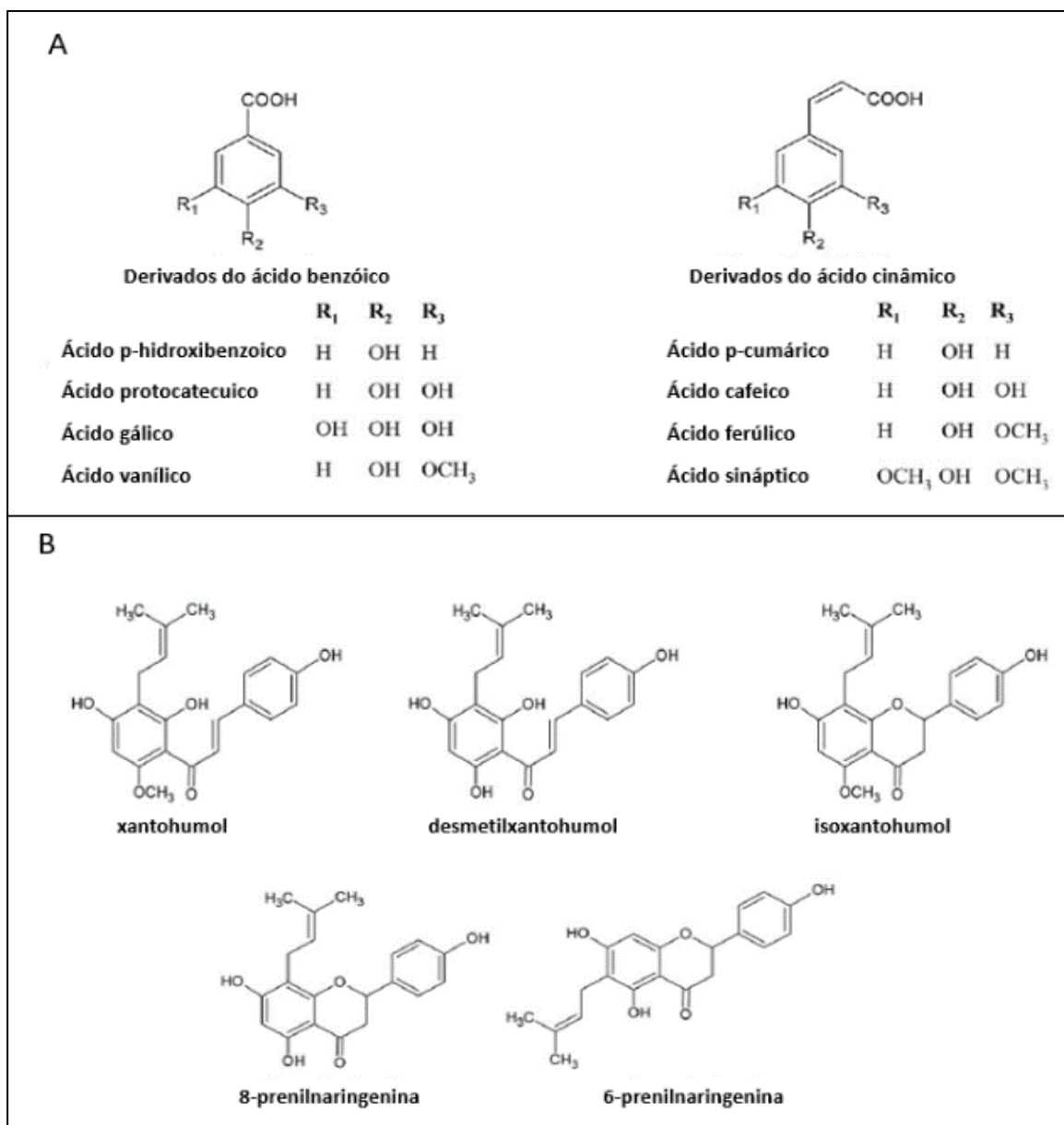


Figura 4: Estruturas químicas dos principais ácidos fenólicos (A) e prenilflavonóides (B) constituintes dos óleos essenciais do lúpulo. Adaptado a partir de [10].

2.3. Leveduras

As leveduras são seres eucarióticos unicelulares, e são também organismos anaeróbios facultativos, o que significa que podem produzir energia tanto por respiração (mecanismo aeróbio) como por fermentação (mecanismo anaeróbio). Uma vez que para a produção de energia sob a forma de moléculas de adenosina-trifosfato (ATP), a respiração é quinze a dezanove vezes mais eficiente que a fermentação, na presença de oxigênio a maioria dos organismos realiza respiração. No entanto, as leveduras comumente empregues no fabrico de

cerveja exibem um fenómeno denominado *Efeito de Crabtree*, o que significa que na presença de elevadas concentrações (acima de aproximadamente 9 g/L) de açúcares fermentáveis, nomeadamente glucose e sacarose, elas tendem a realizar fermentação em vez de respiração, mesmo que na presença de oxigénio. À partida esta repressão pode parecer contraproducente, visto o metabolismo aeróbio ser mais eficiente em termos energéticos que a fermentação, mas esta última oferece a vantagem de resultar na produção de etanol, que por sua vez dificulta o crescimento de microorganismos concorrentes [12]. Este fenómeno acontece porque a presença de glucose e sacarose no meio despoleta aquilo que se denomina de Via principal de repressão pela glucose (Figura 5).

No fundo, isso significa que existindo glucose extracelular, esta é absorvida através de um dos transportadores de hexoses (Hxt) e subsequentemente fosforilada em glucose 6-fosfato (glucose-6P) por uma das hexoquinases (Hxk). Este processo de fosforilação leva à inativação da proteína Snf1 e subsequentemente à construção de um complexo proteico (constituído pelas proteínas Sip1, Snf1 e Snf4) sem capacidade para fosforilar a proteína Mig1 e ligação ao DNA. A proteína Mig1 não fosforilada pode atravessar a membrana nuclear, passando do citoplasma para o núcleo. Uma vez no interior do núcleo, a Mig1 recruta os repressores gerais Tup1 e Ssn6, formando um segundo complexo proteico que vai atuar como fator de transcrição, ao ligar-se ao promotor de vários genes reprimidos pela glucose para impedir que eles sejam expressos. Esses genes incluem os que codificam para enzimas envolvidas na respiração (nomeadamente no Ciclo de Krebs), mas também os que codificam para enzimas envolvidas na gluconeogénese, e ainda nos genes *GAL*, *MAL* e *SUC* que codificam para proteínas importantes na metabolização de fontes alternativas de carbono como a galactose, a maltose e a sacarose, respetivamente [12]. Por outro lado, quando a glucose extracelular se esgota, a proteína Snf1 é ativada, levando à fosforilação da Mig1 que por isso volta ao citoplasma, onde já não consegue reprimir os seus alvos. Assim, a repressão pela glucose é aliviada e as fontes alternativas de carbono já podem ser utilizadas. Além da glucose, parece que a frutose e a sacarose, que é hidrolisada extracelularmente em mais glucose e frutose, exercem efeitos de repressão catabólica semelhantes, embora a glucose continue a ser o açúcar absorvido preferencialmente [12]. Desta forma, a Via principal de repressão pela glucose garante que os açúcares preferidos são metabolizados antes do consumo dos carboidratos alternativos, como a maltose e a galactose [12].

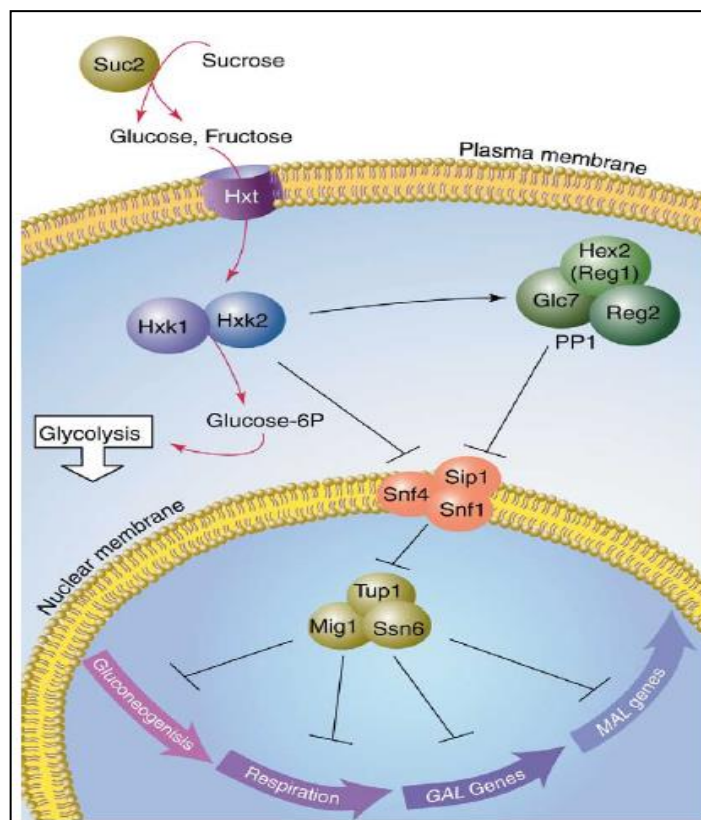


Figura 5: Principal via de repressão pela glucose em *Saccharomyces cerevisiae*. Retirado de [12].

Além de exibirem o *Efeito de Crabtree*, as leveduras pertencentes ao género *Saccharomyces* conseguem produzir um elevado teor de etanol com grande eficiência e são capazes de tolerar numerosos stresses ambientais (como a presença de etanol), o que faz com que sejam as leveduras habitualmente utilizadas no fabrico de cerveja, com o principal objetivo de converter os açúcares fermentáveis do mosto em etanol e CO₂ por fermentação alcoólica. Dentro do género *Saccharomyces*, as leveduras cervejeiras podem ser tradicionalmente divididas em dois grandes grupos, que são as leveduras *ale* e as leveduras *lager*, responsáveis pela fermentação das cervejas *ale* e *lager*, respetivamente. Em termos gerais, as *ale* estão mais próximas do tipo mais antigo de cerveja, enquanto as *lager* só foram desenvolvidas mais recentemente, no século XV. Contudo, a partir do final do século XIX, as *lager* ganharam ampla aceitação e tornaram-se o tipo de cerveja mais popular, representando atualmente mais de 90 % da cerveja que é produzida em todo o mundo [13].

Outra propriedade de grande parte das leveduras cervejeiras é a sua capacidade de floculação, sendo este um processo assexuado, reversível e dependente de cálcio, no qual as células aderem umas às outras para formar grandes agregados (flocos) constituídos por milhares de células (Figura 6). Posteriormente, esses flocos tendem a separar-se do meio por

uma de duas formas: sedimentação no fundo do recipiente de fermentação, no caso das leveduras lager, ou subindo à superfície do mosto fermentado, no caso das leveduras ale [14]. Por este motivo, originalmente, as leveduras ale foram denominadas de *top-fermenting* e as lager de *bottom-fermenting* [13]. Esta capacidade de floculação é de grande importância para a indústria cervejeira, pois fornece uma maneira eficaz, ecológica, simples e sem custos de separar as leveduras da cerveja. No entanto, é importante que as células não floculem antes do mosto ser completamente atenuado, isto é, antes de todos os açúcares fermentáveis nele presentes terem sido fermentados, pois isso tornaria as fermentações lentas e poderia levar ao desenvolvimento de *off-flavours*. Como tal, a levedura cervejeira deve exibir uma forte floculação, mas apenas no final da fermentação, e esse comportamento deve permanecer durante ciclos consecutivos de fermentação, recolha, armazenamento e reinoculação.

De forma muito simplista, a floculação envolve proteínas denominadas floculinas (proteínas tipo lectinas) que, quando ativadas por íons de cálcio presentes no meio, se estendem das paredes celulares das leveduras floculantes e se ligam seletivamente aos resíduos de manose presentes nas paredes celulares das leveduras adjacentes. Como os resíduos de manose estão sempre presentes nas paredes celulares das leveduras, o fator crítico para a floculação é a presença ou ausência das floculinas [14]. Além disso, este processo pode ser inibido pela presença de manose no meio (fenótipo Flo1), a qual se irá ligar às floculinas livres, impedindo que estas se liguem aos resíduos de manose presentes na parede das células adjacentes; é o que acontece na maior parte das estirpes de laboratório. Noutros casos, a floculação também pode ser inibida pela glucose, sacarose e maltose (fenótipo NewFlo), que é o que acontece frequentemente nas leveduras que são utilizadas na indústria cervejeira [14].

A floculação é, portanto, um processo bastante complexo, e não são raros os casos em que as estirpes utilizadas nas fermentações industriais não conseguem flocular [14]. Apesar disso, atualmente, devido aos avanços tecnológicos nos equipamentos das cervejarias mais modernas, na maior parte dos casos tanto as leveduras lager como as ale acabam por sedimentar no fundo (geralmente cónico) dos fermentadores/maturadores [11], o que torna a sua recolha possível, e até bastante fácil, pelo fundo desses equipamentos.

Além das diferenças no que diz respeito à floculação, os dois grandes tipos de leveduras cervejeiras também apresentam diferentes temperaturas ótimas de crescimento e de fermentação, com as ale a preferirem temperaturas de 14-25 °C e as lager a preferirem temperaturas de 4-12 °C. Há ainda distinções quanto à utilização da melibiose e da maltotriose, pois as leveduras lager são as únicas que conseguem metabolizar a melibiose, e também assimilam a maltotriose de forma muito mais rápida [13].

Embora as leveduras de *top-fermenting* possam ser utilizadas para a produção de estilos de cerveja bastante distintos entre si, como é o caso das Ale, das Porter e das Stout, em qualquer um desses casos as estirpes utilizadas pertencem à espécie *S. cerevisiae*. Já as leveduras de *bottom-fermenting* são pertencentes à espécie *S. pastorianus*, sendo esta uma espécie híbrida de *S. cerevisiae* e *S. eubayanus* [13].

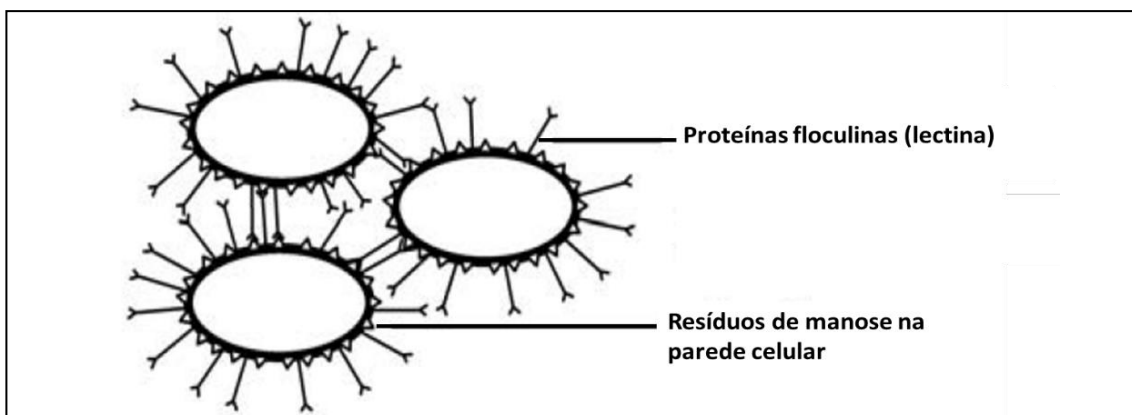


Figura 6: Processo de floculação das leveduras, em que as floculinas das células floculantes se ligam aos resíduos de manoses das células adjacentes. Adaptado a partir de [14].

3. Principais etapas do processo de fabrico de cerveja

Apesar do processo de fabrico de cerveja poder apresentar diversas variações, por exemplo de cervejeira para cervejeira, ou mesmo de estilo para estilo de cerveja, conforme as características pretendidas para o produto final, em qualquer dos casos existe um conjunto de etapas que devem ser efetuadas seguindo uma ordem específica. Assim, na generalidade dos casos, o processo de fabrico de cerveja pode ser resumido da seguinte forma (Figura 7): em primeiro lugar ocorre a maltagem, que consiste em induzir a germinação parcial dos grãos de cereais, para levar à produção e/ou ativação de certas enzimas; segue-se a moagem desse cereal, para expor o seu conteúdo amiláceo e enzimático; o cereal moído é então colocado em água e a mistura vai sendo aquecida para permitir a atuação das enzimas pretendidas, numa etapa denominada brassagem; o líquido que se obtém, denominado mosto, é filtrado para remover cascas de grãos e outras partículas de maiores dimensões, e depois é fervido juntamente com o lúpulo; segue-se a fermentação dos açúcares pelas leveduras e, finalmente, a maturação do mosto já fermentado para eliminar ou pelo menos reduzir o teor de compostos indesejáveis ou melhorar as características organoléticas. A cerveja maturada pode ainda ser filtrada, carbonatada e pasteurizada, antes de se proceder ao seu enchimento.

Para melhor se compreender este processo de fabrico, de seguida será apresentada uma descrição mais pormenorizada de cada uma das etapas acima mencionadas.

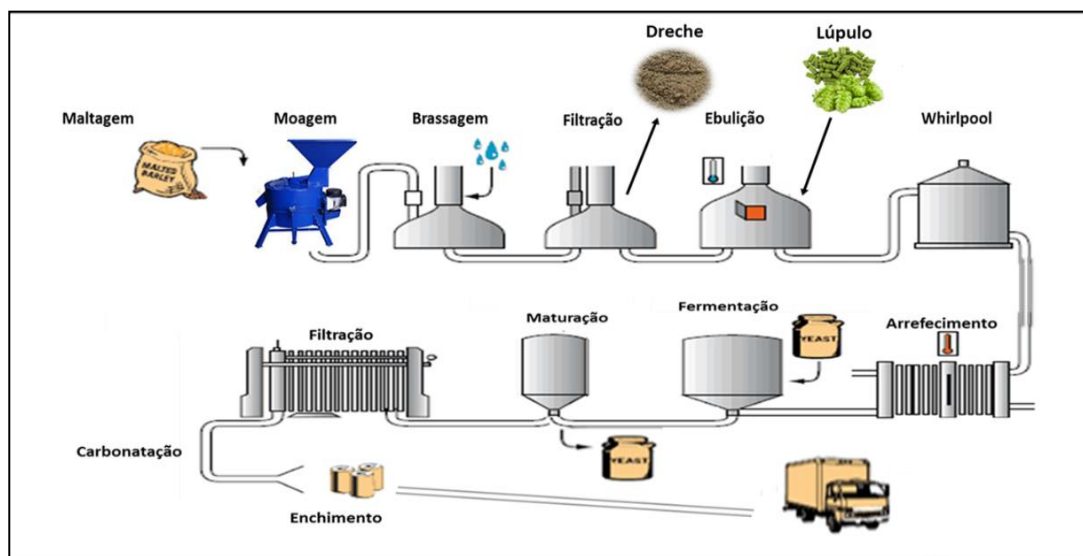


Figura 7: Principais etapas do processo de fabrico de cerveja. Adaptado a partir de [15].

3.1. Maltagem

A maltagem consiste na germinação parcial dos grãos de cereais, sob condições controladas de humidade, tempo e temperatura, com o objetivo de levar à síntese e/ou ativação e libertação das enzimas endógenas desses grãos da forma mais otimizada possível. Para tal, a maltagem é efetuada em três etapas, sendo elas a maceração, a germinação e a secagem. A maceração consiste na imersão dos grãos de cereais em água até estes atingirem um teor de humidade que desencadeará a germinação do embrião [6]. A absorção de água pelos grãos de cereais durante esta fase depende principalmente do tempo de imersão e da temperatura da água, sendo que tempos mais longos e temperaturas mais elevadas aumentam a velocidade com que a água é absorvida, mas também aceleram o crescimento microbiano. Assim, as temperaturas de imersão geralmente empregues variam entre 12 °C e 18 °C. No final desta etapa, o volume dos grãos hidratados é cerca de 1,4 vezes superior ao seu volume original e surge uma pequena raiz branca [7]. Na etapa seguinte, que é a germinação, o grão cresce e surgem várias raízes na sua base, em simultâneo com o crescimento de um acróspiro ao longo do seu lado dorsal. Este crescimento visualmente detetável reflete as mudanças ocorridas no interior dos grãos, onde as hormonas giberelinas induzem a síntese e/ou a ativação e libertação das enzimas hidrolíticas endógenas e a subsequente modificação enzimática do endosperma desses grãos, cujas paredes celulares são despolimerizadas e as proteínas de armazenamento

são catabolizadas, para permitir a liberação dos grânulos de amido contidos na sua matriz e a germinação do embrião. Apesar da produção de enzimas, da desintegração das paredes celulares, da hidrólise das proteínas e da liberação dos grânulos de amido serem necessárias, o crescimento do embrião deve ser mantido no mínimo, de modo a reduzir a perda de biomassa através da respiração bem como da remoção dos acróspiros e das radículas no final da maltagem. Assim, as condições, nomeadamente de temperatura e humidade, durante esta fase devem ser cuidadosamente controladas [6, 7].

Por fim, na etapa de secagem, o malte verde é transferido para um forno que possui um fundo falso onde circula uma grande quantidade de ar quente, para reduzir o teor de humidade desses grãos até níveis adequados ao armazenamento dos mesmos, e assim interromper a germinação e o crescimento da planta, preservar as enzimas desenvolvidas, e gerar compostos com cor, sabor e/ou aroma que irão ajudar a definir o caráter final da cerveja, como é o caso das melanoidinas resultantes das reações de Maillard que devem existir em maior quantidade no caso dos maltes mais escuros [6, 7]. No final da secagem, antes do malte ser armazenado, ele deve ser arrefecido e os acróspiros e as radículas devem ser removidos, já que não possuem utilidade para as etapas posteriores e podem provocar uma absorção descontrolada de água [9].

No que diz respeito às enzimas endógenas que são sintetizadas e/ou ativadas e libertadas durante maltagem, as mais relevantes incluem α -amilases, β -amilases, dextrinases-limite, xilanases, β -glucanases, endo- e exo-proteases e lipases, todas elas com funções importantes no processo de fabrico da cerveja [6].

As α -amilases, β -amilases e dextrinases-limite vão transformar o amido dos grãos de cereais em açúcares fermentáveis e, em conjunto, contribuem para o poder diastático do malte – medida da quantidade de enzimas capazes de converter o amido em açúcares mais simples – apesar da atividade das β -amilases e das dextrinases-limite poder ser inibida pela presença de inibidores proteicos no malte [9]. As β -amilases (BB) hidrolisam as ligações α -(1,4)-D-glicosídicas das cadeias lineares da amilose e da amilopectina, cortando de duas em duas unidades a partir da extremidade não redutora (NRE) dessas cadeias, e libertando assim essencialmente maltoses (Figura 8). Contudo, sendo a β -amilase uma exoenzima, ela não é capaz de atacar o interior das cadeias de amido e por isso a endoenzima α -amilase é necessária como uma enzima precedente. As α -amilases (AA) também hidrolisam as ligações α -(1,4)-D-glicosídicas das cadeias lineares da amilose e da amilopectina, mas de forma aleatória e apenas no interior dessas cadeias, produzindo essencialmente glucoses e maltoses e fornecendo mais substrato para a atuação das β -amilases (Figura 8). Uma vez que ambas as amilases são incapazes de hidrolisar ligações α -(1,6) em polissacarídeos ramificados como a amilopectina, estas duas enzimas vão atuando nas cadeias lineares do amido até que quando se aproximam de

uma ramificação da amilopectina já não conseguem atuar e originam um oligossacarídeo de glucose com pelo menos uma ligação α -(1,6) denominado dextrina-limite. Como tal, da ação conjunta destas duas amilases resultam essencialmente glucoses, maltoses e maltotrioses que são fermentáveis, mas também outros oligossacarídeos como as dextrinas-limite que normalmente as leveduras cervejeiras não conseguem fermentar. As dextrinases-limite (DL) são enzimas capazes de clivar as ligações α -(1,6)-D-glicosídicas dessas dextrinas-limite, mas geralmente a sua contribuição para tal é muito pequena, uma vez que elas são facilmente inativadas a temperaturas relativamente baixas, e por isso a maioria das dextrinas-limite irá aparecer no produto final, conferindo-lhe uma doçura residual [7, 8].

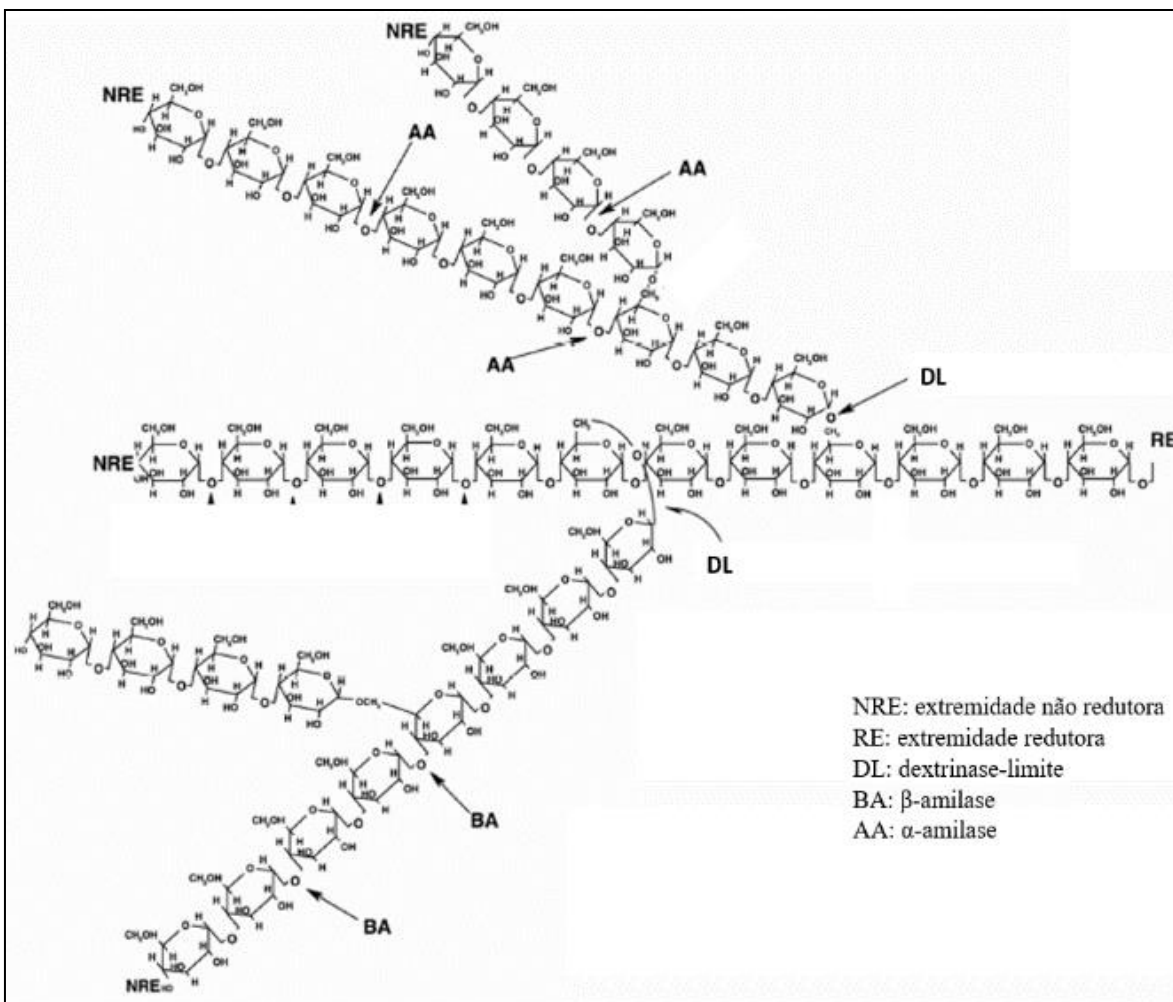


Figura 8: Modo de atuação das enzimas α -amilases (AA), β -amilases (BA) e dextrinases-limite (DL), nas cadeias de amilose e amilopectina do amido dos cereais. Adaptado a partir de [16].

As xilanases e as β -glucanases atuam sobre as ligações glicosídicas das arabinoxilanas e das β -glucanas, respetivamente, que são os polissacarídeos não amiláceos mais abundantes nas paredes celulares do endosperma dos grãos de cereais e, como tal, são essenciais para a

mobilização de nutrientes [3]. Além disso, sendo as arabinoxilanas e as β -glucanas maioritariamente polissacarídeos de elevada massa molecular e com ligações do tipo β (mais precisamente β -1,3 e β -1,4) que as leveduras cervejeiras não conseguem degradar, a sua presença em teores elevados no mosto resulta no aumento da viscosidade e da turbidez da cerveja, dificultando a sua posterior filtração e clarificação. Contudo, ao serem parcialmente degradadas durante a maltagem pelas xilanases e β -glucanases endógenas do cereal, cuja atividade aumenta durante a maceração e atinge o máximo na germinação, as arabinoxilanas e as β -glucanas dão origem a polissacarídeos de menor massa molecular que possuem diferentes solubilidades e propriedades moleculares, não prejudicando tanto a filtração nem a clarificação do mosto e da cerveja [17].

Por fim, a atuação das proteases, não só vai aumentar o teor de compostos azotados livres (*FAN*) disponíveis para a levedura, tais como aminoácidos, pequenos péptidos e amónia, como também vai melhorar a extração dos açúcares fermentáveis ao degradar as proteínas inibidoras das β -amilases e das dextrinases-limite [6].

Apesar da cevada maltada continuar a ser a principal fonte de açúcares e de outros nutrientes para as leveduras, em muitos locais do mundo a indústria cervejeira tem vindo a substituir parcialmente esse malte por grãos não maltados, tanto de cevada como de outros cereais, os quais são designados de adjuntos e são utilizados em proporções variadas, cujos limites máximos permitidos são muitas vezes definidos pela legislação local. A utilização de adjuntos em substituição total ou parcial do malte de cevada, tem em vista principalmente a redução dos custos associados ao processo de maltagem e também a redução dos custos pela utilização de grãos nativos mais baratos, em vez de maltes de cevada importados que são mais caros. Como tal, a escolha dos grãos não maltados a utilizar depende principalmente dos cereais mais disponíveis ou melhor adaptados em cada continente, como é o caso da cevada e do milho na Europa, do arroz na Ásia, do sorgo na África e do milho na América [6]. Atualmente, as fontes mais importantes de adjuntos para a produção de cerveja em todo o mundo são os grãos de milho e de arroz refinados [7]. Muitas vezes, a utilização de adjuntos também pode ser motivada pela tentativa de se produzirem cervejas com características inovadoras que vão ao encontro daquilo que os consumidores procuram (como é o caso das cervejas isentas de glúten ou com um teor proteico diferente do habitual). Outras vantagens da utilização de cereais não maltados incluem uma menor perda de biomassa (que seria causada pela respiração e pela remoção dos acróspiros e radículas no final da maltagem) e uma melhoria significativa na sustentabilidade ambiental (ao economizar-se água que seria necessária para a maceração e germinação dos grãos, e energia que seria necessária para a posterior secagem dos mesmos no final da maltagem) [6].

Contudo, a utilização de adjuntos pode implicar o fornecimento de enzimas hidrolíticas apropriadas ao processo de brassagem, para substituir aquelas que apenas seriam produzidas e/ou ativadas e libertadas durante a maltagem dos cereais. Essas enzimas podem ser fornecidas através da aplicação simultânea de uma quantidade adequada de cereais maltados, ou através da adição de enzimas exógenas (Figura 9). No entanto, além dos grãos não maltados não possuírem as enzimas que seriam produzidas e/ou ativadas e libertadas durante a maltagem, eles ainda possuem o seu endosperma nativo contendo grânulos de amido que não estão acessíveis às enzimas hidrolíticas e, por esse motivo, devem ser sujeitos a um pré-tratamento antes da brassagem, para promover a gelatinização desse amido – o que aumenta o consumo de energia. Outra desvantagem do uso de adjuntos amiláceos é que é sempre necessária uma complementação com fontes adequadas de azoto para garantir uma fermentação também adequada. Além disso, num mosto produzido apenas com malte, a maltose é responsável por cerca de 60 % do total de açúcares fermentáveis, enquanto a glucose é responsável por apenas cerca de 20 % desse total, mas os adjuntos amiláceos contêm uma proporção relativa de glucose superior ao malte e, uma vez que a fermentação da maltose é reprimida pela glucose, isso significa que os padrões de fermentação serão diferentes entre mostos que são produzidos só com malte, com uma mistura de malte e adjuntos, ou só com adjuntos [7].

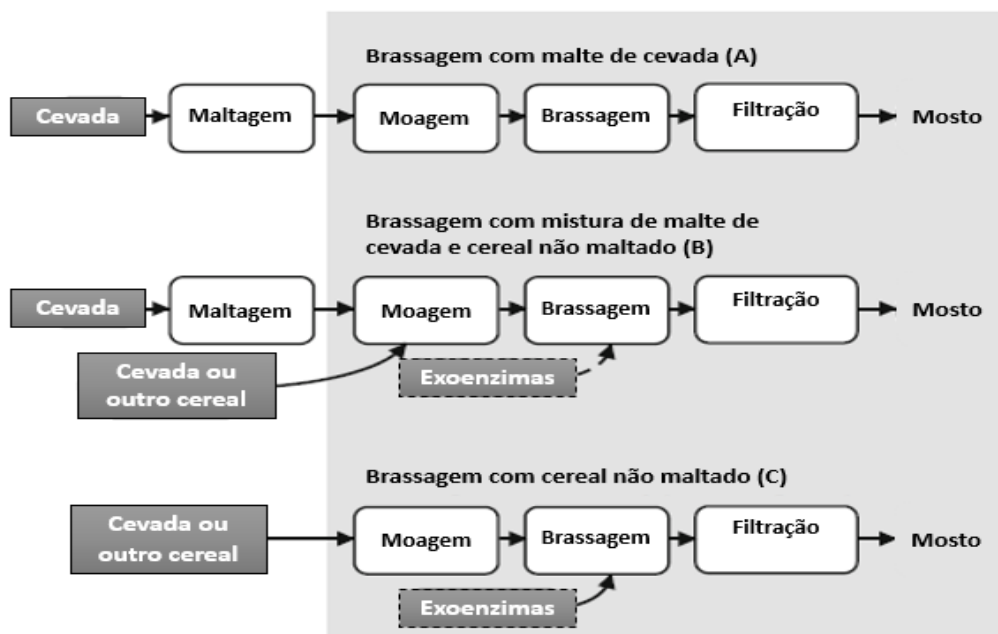


Figura 9: Principais diferenças entre a produção de mosto com: (A) malte de cevada, (B) uma mistura de malte de cevada e cereais não maltados, e (C) apenas cereais não maltados.

Adaptado a partir de [6].

3.2. Moagem

A moagem dos grãos de cereais (geralmente cevada maltada) consiste na sua decomposição mecânica para aumentar a exposição do seu endosperma amiláceo e do seu conteúdo enzimático, de modo a facilitar os passos seguintes de extração e solubilização. Neste sentido, uma moagem insuficiente fará com que muito do amido permaneça adsorvido à bainha dos grãos e seja descartado juntamente com eles na fase de filtração do mosto, resultando assim numa reduzida conversão do amido em açúcares fermentáveis durante a brassagem e, conseqüentemente, numa brassagem com baixo rendimento. Por outro lado, uma moagem excessiva poderá levar à extração e solubilização de compostos que irão conferir características indesejáveis ao produto final, além de destruir as cascas dos próprios cereais que assim deixam de poder servir como um meio adequado para a filtração do mosto. Com a moagem excessiva, formar-se-á um meio filtrante menos poroso, cujos poros entupirão muito rapidamente durante a filtração do mosto, implicando maiores tempos de escoamento do filtrado e possivelmente a necessidade de soltar mecanicamente o meio filtrante [7].

A moagem pode ser húmida ou seca, sendo que esta última é bastante mais frequente na indústria cervejeira e normalmente é efetuada em moinho de rolos ou de martelo [7]. Geralmente a moagem em moinho de rolos produz um granulado mais grosseiro e mantém a maior parte das cascas dos grãos intactas, enquanto a moagem em moinho de martelo tende a produzir uma farinha mais fina e a destruir grande parte das cascas. Assim, no caso da cevada não maltada por exemplo, que é mais dura e difícil de desintegrar que o malte de cevada, esses grãos de cereais devem ser preferencialmente moídos num moinho de martelo [6].

O desempenho da moagem também depende da composição dos grãos em amido, proteínas e β -glucanas, pois um endosperma com maior teor de amido é mais suave e por isso tende a originar uma farinha mais fina durante a moagem, enquanto um endosperma com maior teor de proteínas e de β -glucanas é mais duro e por isso tende a produzir um granulado mais grosseiro durante esse processo [6].

3.3. Brassagem

A brassagem tem por objetivo promover a extração e a subsequente transformação dos componentes nutricionais dos grãos (como o amido e as proteínas) para moléculas mais simples (como açúcares fermentáveis e pequenos péptidos/aminoácidos), através da hidrólise catalisada pelas enzimas ativadas durante a maltagem. Uma vez que diferentes classes de enzimas possuem diferentes temperaturas ótimas de atuação, a nível industrial a brassagem consiste em misturar o cereal moído com água e em ir aquecendo a mistura numa série de

etapas, para temperaturas sucessivamente maiores (rampas de temperatura), intercaladas com períodos de descanso de duração apropriada e a temperaturas específicas, consideradas as temperaturas ótimas de atuação para cada classe de enzimas. Estas rampas de temperatura podem ser efetuadas por infusão, quando todo o volume de meio é aquecido em simultâneo, ou por decocção, quando apenas uma parte do meio é removida e aquecida antes de ser adicionada ao resto da mistura [3]. No caso da brassagem por infusão, que é a mais comum, geralmente numa primeira fase a temperatura é aumentada até aproximadamente 50 °C e deixada assim durante alguns minutos para que as proteases tenham tempo de converter as proteínas em aminoácidos, os quais serão posteriormente utilizados para o crescimento e multiplicação das leveduras; numa segunda fase a temperatura é aumentada até 62-65 °C e deixada assim também alguns minutos para que as β -amilases possam hidrolisar as ligações α -(1,4) das cadeias do amido; numa terceira fase a temperatura é aumentada até cerca de 72-75 °C e, mais uma vez, mantida assim por algum tempo para que também as α -amilases possam atuar nas ligações glicosídicas do amido; por fim, a temperatura é aumentada até um valor próximo de 78 °C principalmente para interromper a atividade enzimática da lipoxigenase, evitando-se assim o desenvolvimento de sabores e aromas a ranço. As rampas de temperatura e os tempos de repouso podem ser modificados consoante o tipo de cereal utilizado e o tipo de cerveja pretendido. Por exemplo, tendo em conta que as α -amilases são muito mais termoestáveis que as β -amilases, se se utilizarem temperaturas mais elevadas (próximas de 70 °C) reduz-se a atividade da β -amilase e aumenta-se a da α -amilase, com o que se obtém uma maior proporção de açúcares não fermentáveis que irão resultar num produto com maior doçura residual e menor teor alcoólico. Por outro lado, se se utilizarem temperaturas mais baixas (entre 63 e 65 °C) aumenta-se a atividade da β -amilase e mantém-se a da α -amilase, com o que se obtém uma maior proporção de açúcares fermentáveis que irão resultar num produto com menor doçura residual e maior teor alcoólico [18].

Além das reações descritas, também irão ocorrer reações catalisadas pelas xilanases cuja temperatura ótima de atuação é de 45 °C, e pelas β -glucanases cuja temperatura ótima de atuação é de 60 °C ou de 45-50 °C, consoante o alvo sejam ligações β -(1,3) ou β -(1,4), respetivamente [18].

Como já foi referido anteriormente, dependendo dos cereais utilizados, antes de se aplicarem estas rampas de temperatura ainda pode ser necessário um pré-tratamento dos mesmos a uma temperatura específica para promover a gelatinização do seu amido. Isto verifica-se por exemplo para o sorgo, milho e arroz, cujos amidos possuem uma temperatura de gelatinização tão elevada que a aplicação dessa temperatura durante a brassagem inativaria as enzimas responsáveis pela sua hidrólise. No caso do malte de cevada, a gelatinização do

amido pode ser completada à temperatura de repouso da sacarificação e por isso, quando a brassagem é efetuada com malte de cevada, não é necessário um passo separado para a gelatinização do amido [18].

No final da brassagem obtém-se um líquido turvo e adocicado, contendo açúcares fermentáveis, proteínas e outros compostos, ao qual já se pode dar o nome de mosto [6].

3.4. Filtração do mosto

A filtração que se segue à brassagem consiste numa separação sólido-líquido que tem por objetivo separar todo o material sólido insolúvel (por exemplo as cascas dos grãos) do volume de líquido que contém os compostos do malte dissolvidos. Este líquido que contém os compostos dissolvidos é o mosto propriamente dito, enquanto o material sólido insolúvel que é separado do mosto denomina-se de dreche e geralmente é aproveitado para alimentação animal ou explorado para outras aplicações industriais [6, 7]. Na prática, os sistemas mais amplamente utilizados para fazer esta separação são o *lauter tun* e o *mash filter*, enquanto os processos de separação por membranas raramente são utilizados [7].

No caso dos *lauter tuns*, os mais comuns possuem uma placa de filtração que é um fundo falso perfurado com ranhuras definidas. Assim, os grãos gastos e as suas cascas ficam apoiados sobre esse piso perfurado, de tal forma que o mosto se infiltra através desse leito de material sólido e se acumula no espaço abaixo. Além disso, há um dispositivo de pulverização que liberta água de aspersão para lavar todos os açúcares do material sólido insolúvel. Geralmente, o mosto é bombeado a partir do fundo do *lauter tun* para evitar a sua aeração excessiva e, no final, o mosto que escorre deve ser o mais claro possível, não deve possuir qualquer partícula capaz de se desintegrar ainda mais durante a ebulição e pode conter apenas pequenas quantidades de ácidos gordos de cadeia longa, que destroem a espuma. Já nos *mash filters*, a mistura é transferida para uma prensa de filtro que se encontra organizada verticalmente e o mosto líquido é mecanicamente separado dos grãos gastos com filtros de tecido e pressão [7].

As principais características que diferenciam os *mash filters* dos *lauter tuns* são: (i) independência da qualidade do malte e da proporção de adjuntos, (ii) filtração mais rápida do primeiro mosto mais concentrado, (iii) maior rendimento e (iv) principalmente um filtro mais resistente. Portanto, no *lauter tun* é importante que pelo menos uma grande parte das cascas do malte permaneçam intactas, já que elas são necessárias para formar a camada filtrante de material sólido que é atravessada pelo mosto líquido. Além disso, enquanto a camada de grão gasto se dispõe horizontalmente sobre o fundo falso do *lauter tun*, no *mash filter* essa camada organiza-se verticalmente [7].

Além da presença/ausência de cascas intactas, o tamanho dos grãos moídos também é importante para este processo. Grãos de cereais excessivamente moídos ou que não retêm a sua casca após a debulha (como acontece com o milho, o trigo e o sorgo), resultam num meio filtrante menos poroso e por isso dão origem a um mosto que deve ser filtrado preferencialmente através dos *mash filters*. Por outro lado, grãos de cereais com um tamanho mais grosseiro e que conseguem preservar a sua casca intacta (como acontece com a cevada), geralmente dão origem a um mosto que pode ser filtrado nos *lauter tuns* [6, 7]. De destacar ainda que um mosto com maior quantidade de β -glucanas e xilanas intactas será mais viscoso e, como tal, será filtrado a uma taxa inferior e aumentará a colmatagem dos filtros [6].

3.5. Ebulição

Na etapa de ebulição, o mosto filtrado é fervido juntamente com o lúpulo, cujos α -ácidos ou humulonas sofrem isomerização convertendo-se assim nos respetivos iso- α -ácidos mais solúveis (Figura 10), que são os grandes responsáveis pelo amargor conferido a esse mosto e, subsequentemente, ao produto final [9]. Sendo esta reação mais favorável para temperaturas mais elevadas (100-130 °C), ela apenas ocorre durante esta etapa do processo cervejeiro, mas não com muita eficiência. O mesmo acontece com os β -ácidos, mas a importância destes em termos de amargor é ainda menor, dado eles serem praticamente insolúveis em água [10, 11].

Como já foi mencionado, o lúpulo também possui óleos essenciais que são grandemente responsáveis pelo aroma característico da cerveja. Contudo, esses compostos de aroma são muito voláteis e, portanto, o lúpulo que é adicionado no início da fervura acaba por praticamente só conferir amargor ao produto final. Para que tanto o amargor como o aroma característicos do lúpulo sejam notórios no produto final, além do lúpulo (geralmente mais rico em α -ácidos) que é adicionado no início desta etapa, também algum lúpulo (geralmente mais rico em óleos essenciais) deve ser adicionado no final da mesma, sendo este processo de adição do lúpulo ao mosto apenas no final da fervura conhecido por *late-hopping* [11].

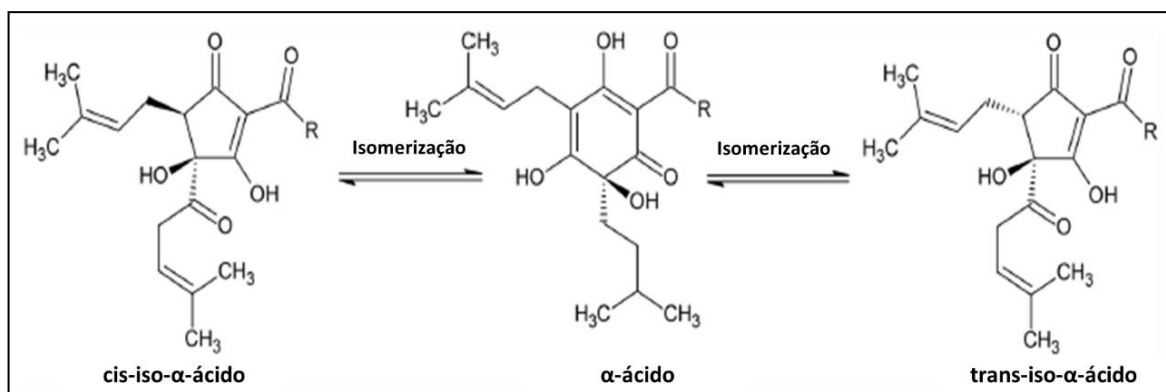


Figura 10: Reação de isomerização dos α -ácidos do lúpulo nos correspondentes iso- α -ácidos.

Adaptado a partir de [10].

O aquecimento ocorrido durante esta etapa também é importante para concentrar o mosto e para inativar qualquer atividade enzimática que ele ainda possa apresentar, caso contrário obter-se-iam cervejas sobre-fermentadas com perfis gustativos atípicos [7]. No entanto, o mesmo aquecimento pode levar à formação de compostos heterocíclicos que têm grande influência no sabor da cerveja. Tais compostos dizem respeito a moléculas orgânicas nas quais um ou mais átomos de carbono são substituídos pelos chamados heteroátomos (como o azoto, o oxigénio ou o enxofre). De entre esses, os compostos N-heterocíclicos são de particular interesse, porque possuem limiares de sabor muito baixos (partes por bilhão ou inferior) e possuem notas de sabor que são descritas como pão, caramelo ou queimado, o que até poderá ser desejável em maltes escuros e cervejas escuras, mas não em cervejas claras. Tais compostos podem surgir, entre outras vias, de reações entre açúcares redutores e aminoácidos, durante o processamento térmico dos alimentos ou das suas matérias-primas, como é o caso da secagem do malte, da fervura do mosto e da pasteurização da cerveja, razão pela qual o seu teor é superior em maltes mais escuros e também em cervejas mais escuras. A fervura do mosto, além da secagem do malte, é a etapa do processo cervejeiro que mais contribui para a formação de compostos N-heterocíclicos. As estruturas de alguns dos compostos heterocíclicos mais importantes conhecidos atualmente encontram-se na Figura 11 [7].

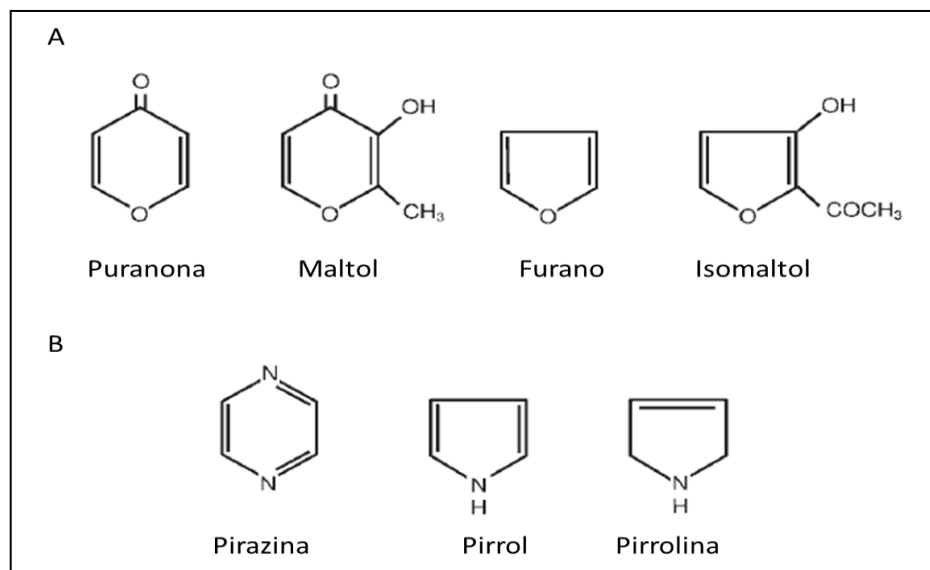


Figura 11: Estruturas base de (A) compostos O-heterocíclicos com sabor a caramelo e malte, e (B) compostos N-heterocíclicos com sabor a cereal, pão e nozes. Adaptado a partir de [7].

Relativamente ao mosto cervejeiro que se obtém no final desta fase, apesar do seu perfil nutricional estar fortemente dependente das matérias-primas utilizadas bem como dos procedimentos efetuados, no geral trata-se de um meio complexo constituído

principalmente por carboidratos mas também por compostos azotados (aminoácidos, péptidos, proteínas, amónia, ácidos nucleicos), lípidos, vitaminas, minerais e outros constituintes presentes em menor quantidade. Quanto aos carboidratos, no seu todo eles compõem cerca de 90 % dos sólidos do mosto e os principais são a glucose, a maltose e a maltotriose (por ordem de preferência pelas leveduras), além de outros que as leveduras cervejeiras não conseguem fermentar (Tabela 2) [19, 20]. Já em termos de minerais, os principais presentes no mosto são o potássio, o cálcio e o sódio (Tabela 3) [20].

Tabela 2: Principais nutrientes presentes no mosto cervejeiro, e suas usuais concentrações. Adaptado a partir de [20].

Nutrientes	Concentração (g/L)
Maltose	38,9 – 57,8
Maltotriose	11,4 – 17,7
Glucose	5,00 – 14,7
Frutose	1,00 – 9,70
Sacarose	1,00 – 5,30
Açúcares fermentáveis totais	67,8 – 95,6
Maltotetraose	2,00 – 12,7
Oligossacarídeos com 4 ou mais resíduos de glucose	19,5 – 29,4
Dextrinas totais	23,9 – 42,1
Açúcares totais	92,6 – 128
Azoto total	0,90 – 1,09
Lípidos totais	0,05 – 0,06
Fosfato total	0,64 – 1,02

Tabela 3: Principais vitaminas e minerais presentes no mosto cervejeiro, e suas usuais concentrações. Adaptado a partir de [20].

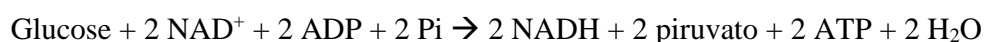
Minerais	Concentração dos minerais (ppm)	Vitaminas	Concentração das vitaminas (mg/100mL)
Potássio	410 – 565	Piridoxina (B6)	$5,8 \times 10^{-2} - 1,1 \times 10^{-1}$
Cálcio	27,0 – 61,0	Ácido pantoténico (B5)	$4,5 \times 10^{-2} - 9,8 \times 10^{-2}$
Sódio	10,0 – 180	Riboflavina (B2)	$3,3 \times 10^{-2} - 9,0 \times 10^{-2}$
Cobre	0,100 – 7,20	Tiamina (B1)	$2,8 \times 10^{-2} - 7,5 \times 10^{-2}$
Ferro	0,400 – 0,500	Ácido fólico	$1,0 \times 10^{-2} - 1,3 \times 10^{-2}$
Zinco	0,100 – 0,500	Biotina	$8,5 \times 10^{-4} - 1,2 \times 10^{-3}$
		Inositol	1,8 – 6,0
		Ácido nicotínico	8,0 – 1,8

3.6. Fermentação

A fermentação é a etapa do processo cervejeiro que permite transformar o mosto em cerveja, pela ação de leveduras [7]. Para tal, o mosto fervido deve ser rapidamente arrefecido, geralmente através de um permutador de calor [11] e, de seguida, inoculam-se as leveduras pretendidas por um processo denominado pitching. Este pitching pode ser realizado adicionando ao mosto por fermentar um volume adequado de suspensão de leveduras ou um volume adequado de outro mosto já em fermentação e, após isso, o mosto que foi inoculado passa a denominar-se de *cerveja verde*. De qualquer forma, o sucesso da fermentação que se segue está dependente, tanto do fornecimento de uma concentração adequada de leveduras com elevada viabilidade, como do fornecimento de uma quantidade suficiente de oxigénio [7].

Uma vez que as leveduras cervejeiras exibem o *Efeito de Crabtree* e que o mosto no qual elas são inoculadas possui uma elevada concentração de açúcares fermentáveis, só nos primeiros momentos após o pitching, e se a quantidade de oxigénio que foi fornecida tiver sido significativa, é que as leveduras irão realizar respiração aeróbia. A ocorrência do metabolismo aeróbio nessa fase inicial é de grande importância, pois permitirá obter uma quantidade de energia muito superior à que seria obtida pelo metabolismo anaeróbio, e essa quantidade de energia é importante para uma rápida multiplicação celular. Enquanto o rendimento energético da respiração aeróbia é de trinta a trinta e oito moléculas de ATP, o da fermentação alcoólica é de apenas duas dessas moléculas [7].

O processo de respiração aeróbia ocorre na mitocôndria das células e envolve um conjunto de reações que no seu todo constituem o Ciclo de Krebs ou Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos. Contudo, antes desse ciclo ter início, uma série de reações tem de ocorrer no citoplasma da célula (Figura 12). Primeiro ocorre a Glicólise, que consiste na conversão da glucose (e frutose) em piruvato, com a formação de ATP e NADH, de acordo com a Equação 1. De seguida, o piruvato resultante da glicólise é transformado em acetil-coA que, ao entrar para a mitocôndria, dá início ao Ciclo de Krebs. Desta forma, o piruvato resultante da glicólise é completamente degradado em CO₂ e água.



(Equação 1)

Pouco tempo depois, com a redução da concentração de oxigénio no meio, as leveduras interrompem o seu metabolismo aeróbio e começam a realizar fermentação alcoólica, a partir da degradação anaeróbia e parcial dos açúcares presentes no meio. Este processo também começa com a conversão da glucose em piruvato mas, de seguida, havendo pouco ou nenhum

oxigênio, no citoplasma o piruvato é descarboxilado em acetaldeído pela enzima piruvato descarboxilase, e esse acetaldeído vai atuar como aceitador final de elétrons, sendo reduzido a etanol e CO₂ pela enzima álcool desidrogenase (codificada pelo gene *ADHI*). Por fim, tanto o etanol como o CO₂ são transportados para fora da células por difusão simples [2].

Apesar dos açúcares fermentáveis presentes em maior quantidade num mosto de cevada típico serem a maltose, a maltotriose, a glucose, a frutose e a sacarose por ordem decrescente de abundância, esses açúcares vão ser assimilados pela levedura seguindo uma ordem diferente: em primeiro lugar é sempre utilizada a glucose, praticamente a par com a utilização da frutose e da sacarose, seguidos da maltose e esta da maltotriose [21]. A glucose é o primeiro açúcar a ser metabolizado porque ela exerce repressão catabólica sobre os outros açúcares, inibindo a síntese dos seus transportadores e, como tal, impedindo a sua metabolização pela levedura enquanto ainda existir glucose no meio. A sacarose é hidrolisada em frutose e glucose, e geralmente todos os monossacarídeos são utilizados antes da maltose e da maltotriose [19].

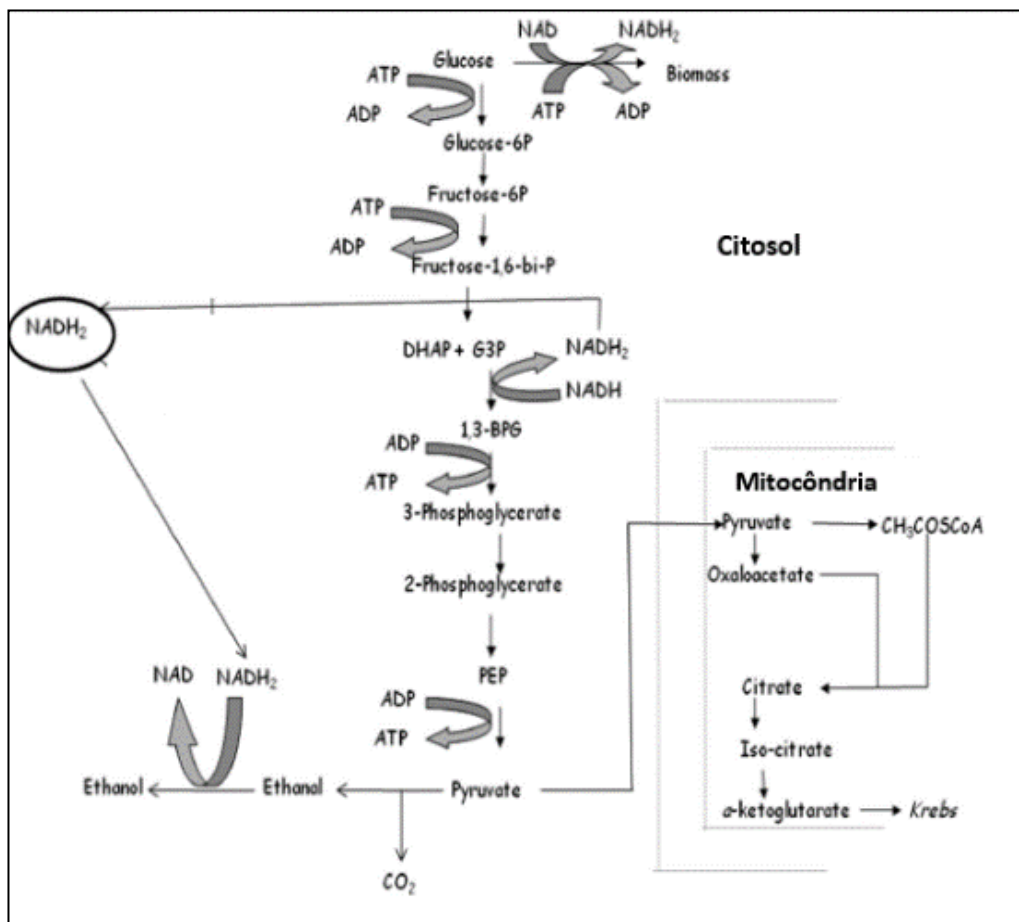


Figura 12: Vias bioquímicas da glicólise e respiração aeróbia (no citoplasma) e da fermentação alcoólica (na mitocôndria). Adaptado a partir de [2].

Além do etanol e do CO₂ que poderá ou não ser aproveitado para carbonatação natural da cerveja [11], durante a fermentação podem surgir outros compostos resultantes do metabolismo das leveduras, os quais podem contribuir significativamente para as propriedades organoléticas do produto final. Entre esses subprodutos do metabolismo das leveduras destacam-se os ésteres, compostos contendo enxofre como o sulfureto de dimetilo (DMS), ácidos orgânicos (sobretudo malato mas também citrato, fumarato, succinato e outros), outros álcoois além do etanol (sobretudo glicerol) e compostos carbonílicos (como o acetaldeído e o diacetilo), em teores que dependem das condições de fermentação, do tipo de cereais utilizados e da estirpe de levedura inoculada. Apesar de alguns destes compostos poderem ser vantajosos para a qualidade organolética do produto final, como é o caso dos ésteres e álcoois, a grande maioria são indesejáveis, como é o caso dos ácidos orgânicos, do DMS, do acetaldeído e do diacetilo [7].

Os ácidos orgânicos, tanto voláteis como não voláteis, resultam da desaminação dos aminoácidos e geralmente são indesejáveis na cerveja porque provocam uma diminuição do seu pH, sendo este um parâmetro que tem influência direta no sabor e no brilho do produto final [7].

Quanto ao DMS, numa concentração de 30-100 µg/L ele é considerado um componente essencial das cervejas lager, contribuindo para o sabor característico das mesmas, mas numa concentração superior a 100 µg/L ele pode conferir aromas e sabores semelhantes aos de milho doce cozido, que são indesejáveis na cerveja. A sua formação ocorre durante a maltagem do cereal; aquando da germinação, sob determinadas condições de temperatura e humidade, pode formar-se o precursor inativo denominado S-metilmetionina; posteriormente, sob o stress térmico provocado pelo calor da secagem, esse precursor inativo pode dar lugar a DMS livre e ao seu precursor ativo denominado sulfóxido de dimetilo (DMSO). Por sua vez, o precursor DMSO também pode ser reduzido a DMS por enzimas das leveduras durante a fermentação [22].

No que diz respeito ao acetaldeído, a sua formação ocorre normalmente durante os primeiros três dias de fermentação, como resultado da descarboxilação do piruvato, tal como já foi referido atrás. Posteriormente, espera-se que todo o acetaldeído seja reduzido a etanol, mas se a sua quantidade dentro da levedura for muito elevada, uma parte dele pode ser libertada diretamente para o mosto sem ser convertida em etanol. Por outro lado, o etanol presente no mosto fermentado pode ser oxidado pela enzima álcool desidrogenase (codificada pelo gene *ADH2*) originando novamente acetaldeído [23]. Além disso, a sua produção também pode resultar da atividade de bactérias acéticas. Se a concentração desse composto for superior a 10-25 mg/L, ele irá conferir sabores e aromas semelhantes aos de maçãs verdes, que são

indesejáveis na cerveja, além de afetar negativamente o tempo de prateleira do produto, pela ocorrência de reações de condensação aldólica durante o seu armazenamento [24]. A remoção das leveduras da cerveja antes da fermentação estar completa, bem como a utilização de leveduras com baixa viabilidade (principalmente por já terem sido reutilizadas demasiadas vezes), são fatores que podem levar ao aparecimento desse aldeído em teores demasiado elevados no produto final [23].

Relativamente ao diacetilo (ou 2,3-butanodiona) e à 2,3-pentanodiona, estes dois compostos são formados a partir de intermediários da biossíntese dos aminoácidos valina e isoleucina, respetivamente. Durante a fermentação, a valina e a isoleucina são necessárias de imediato para o crescimento da levedura, pelo que a célula as sintetiza originando os subprodutos α -acetolactato e α -acetohidroxibutirato, respetivamente. O excesso desses subprodutos que se acumula no interior da levedura, por não ser todo gasto na síntese dos aminoácidos que os têm como precursores, acaba por ser exportado para o mosto, onde o α -acetolactato e o α -acetohidroxibutirato se convertem espontaneamente em diacetilo e em 2,3-pentanodiona, respetivamente, por descarboxilação oxidativa. Na cerveja final estes compostos conferem uma conotação amanteiga que é indesejável, e eles possuem baixo limiar de deteção (0,5-0,6 mg/L no caso da 2,3-pentanodiona e 0,08-0,2 mg/L no caso do diacetilo), pelo que a sua presença se faz sentir mesmo para baixas concentrações [7].

No que aos fermentadores diz respeito, ao longo do tempo o seu design foi evoluindo consoante as necessidades. Inicialmente esse design baseava-se sobretudo nas diferentes propriedades das leveduras de *top-fermenting* e de *bottom-fermenting*, bem como na disponibilidade de materiais para a sua construção. Atualmente, existem designs bastante diferentes, que vão desde fermentadores quadrangulares até tanques cilíndricos, sendo os fermentadores cilindro-cónicos de aço inoxidável os mais usuais. Estes fermentadores são constituídos por um cilindro vertical com uma base cónica, e são dos preferidos pela indústria cervejeira por: permitirem rentabilizar melhor o espaço disponível (que é ocupado em altura, em vez de em largura), serem mais fáceis de limpar e higienizar (através do CIP, do inglês *clean in place*), serem resistentes à corrosão, possuírem boa condutividade térmica (facilitando o controlo da temperatura ao longo da fermentação) e permitirem reduzir o desperdício (facilitam a recolha das leveduras, bem como a recolha ou não do CO₂) [25].

O tempo que esta etapa demora depende muito do estilo de cerveja, da concentração, viabilidade e tipo de leveduras utilizadas, das condições do processo (nomeadamente temperatura), entre outros fatores. Contudo, por exemplo para uma cerveja do estilo *American Pale Lager*, fermentada por leveduras lager a uma temperatura de 8-12 °C, a fermentação deverá durar dois a cinco dias; enquanto para uma cerveja do estilo *British Pale Ale*,

fermentada por leveduras ale a uma temperatura de 17-22 °C, deverá demorar apenas dois a três dias [7].

3.7. Maturação

A maturação tem como principal objetivo eliminar ou pelo menos reduzir o teor de compostos indesejáveis presentes no mosto fermentado, sendo alguns dos mais importantes o diacetilo e o acetaldeído.

A presença do diacetilo e da 2,3-pentanodiona na cerveja final em teores acima de 0,08-0,2 mg/L e de 0,5-0,6 mg/L, respetivamente, é indesejável. Contudo, durante a maturação a baixa temperatura, é possível que a levedura venha a captar esses compostos e os converta enzimaticamente em 2,3-butanodiol e acetoína e em 2,3-pentanodiol (Figura 13), os quais, apesar de também serem indesejáveis, possuem limiares de deteção bastante superiores e, portanto, menor influência nas características organolépticas do produto final [7, 22]. Neste sentido, a concentração total de diacetilo é frequentemente utilizada para avaliar a maturidade da cerveja fermentada, e deve ser reduzida abaixo do limiar de deteção através da tecnologia de fabrico da cerveja; como na cerveja já filtrada (sem levedura) o α -acetolactato se pode transformar em diacetilo e este já não pode ser decomposto, o α -acetolactato também deve ser adicionado ao cálculo da concentração total de diacetilo [22]. Até ao momento, foram desenvolvidos vários ensaios para determinação do diacetilo. Um deles foi desenvolvido para medir os níveis de diacetilo no sangue, através do método Westerfeld, e trata-se de um ensaio colorimétrico no qual o diacetilo e a acetoína reagem com a creatina na presença de α -naftol, para formar um composto cromogénico que pode ser quantificado espectrofotometricamente; como o diacetilo reage mais rápido que a acetoína, o teor desse composto pôde ser determinado com sucesso na presença de acetoína. Outras técnicas mais recentes e frequentemente utilizadas para determinar o teor de diacetilo são a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de elevada resolução (HPLC) [26].

Quanto ao acetaldeído, a sua presença no produto final em concentrações superiores a 10-25 mg/L também é negativa. No entanto, assim como o diacetilo pode vir a ser captado pela levedura durante a maturação a baixa temperatura, o acetaldeído também pode, pelo que durante esta fase o seu teor é reduzido geralmente abaixo do seu limiar de deteção. Normalmente, o teor de acetaldeído numa cerveja não maturada é de 20-40 mg/L, enquanto numa cerveja acabada é de apenas 8,0-10 mg/L [7]. A determinação do seu teor na cerveja é geralmente efetuada por GC ou HPLC [24].

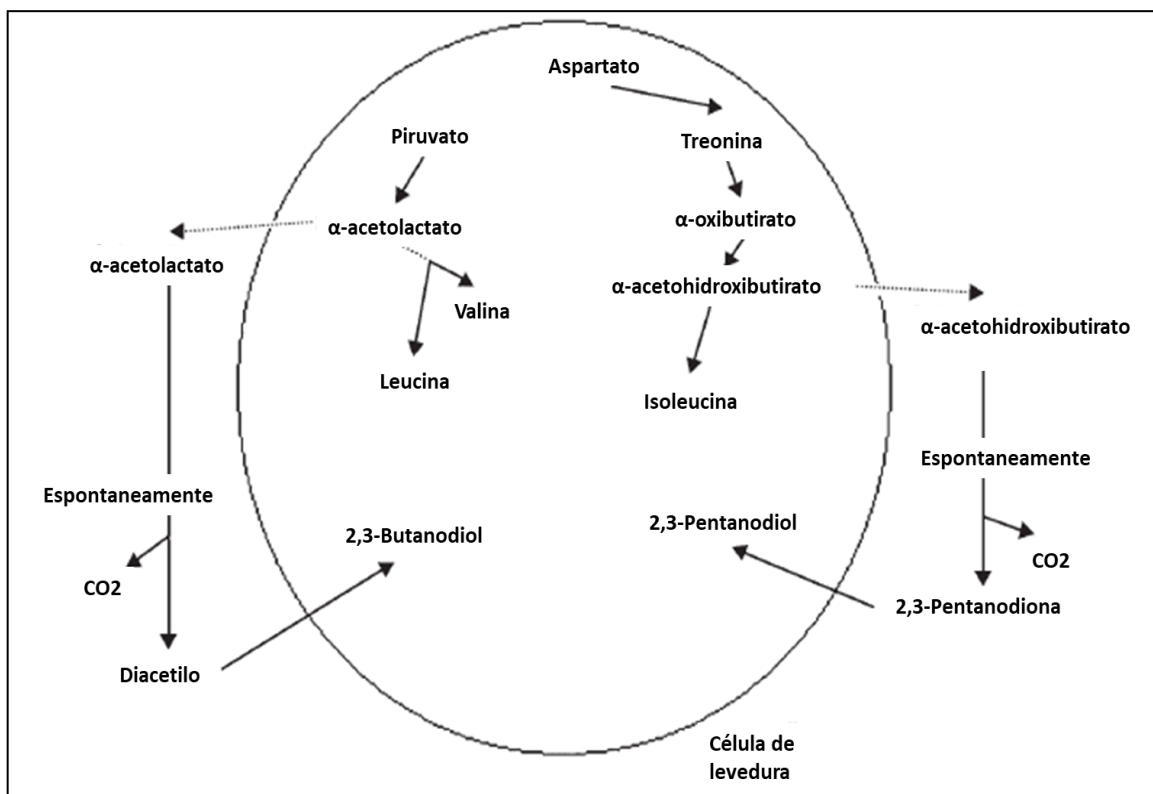


Figura 13: Formação do diacetil e da 2,3-pentanediona. Adaptado a partir de [22].

Uma vez que a turbidez do mosto é geralmente superior á da cerveja maturada, supõe-se que a realização desta etapa a baixa temperatura contribua para a remoção de substâncias responsáveis pela turbidez da cerveja. Além disso, o processo de maturação torna o sabor da cerveja mais refinado e arredondado, melhorando-o significativamente em comparação com a mesma cerveja não maturada. No caso de se usarem maturadores com fundo cónico, outro objetivo da maturação consiste em promover a sedimentação da levedura no fundo desse recipiente para que, assim, ela seja mais fácil de recolher. A levedura sedimentada deverá encontrar-se exposta a elevados teores de etanol e CO₂, bem como a uma elevada pressão hidrostática e, eventualmente, a temperaturas mais elevadas no fundo do recipiente, pelo que a sua remoção da cerveja é importante. Se essa levedura recolhida não possuir um cheiro intenso a enxofre e apresentar uma viabilidade elevada, ela poderá ser armazenada a baixa temperatura (0-3 °C) para, posteriormente, ser reinoculada num novo mosto por fermentar [7].

Quanto ao período de maturação mais adequado, não existe um valor estipulado, pois esse período depende de uma grande variedade de fatores como as condições (nomeadamente de temperatura) a que ocorre, o estilo de cerveja e o tipo de maturador, entre outras. Contudo, por exemplo para cervejas do estilo *American Pale Lager*, a uma temperatura inferior a 3 °C, esta etapa pode demorar de duas a doze semanas [7].

3.8. Filtração da cerveja

A filtração, ou clarificação como também pode ser chamada, é uma etapa levada a cabo com o principal objetivo de remover a maior parte das leveduras residuais e também o material proteico, dextrinas, β -glucanas e polifenóis presentes em suspensão, de modo a reduzir a turbidez da cerveja para níveis considerados aceitáveis para os consumidores, a aumentar a sua estabilidade (impedindo a ocorrência de qualquer mudança visível a longo prazo) e a prolongar o seu prazo de validade. Trata-se por isso de uma etapa com grande influência na qualidade do produto final [22].

Atualmente, a maior parte da cerveja produzida em todo o mundo é clarificada recorrendo a filtros tradicionais de terra diatomácea (*kieselguhr*), sendo esta um pó formado a partir de esqueletos fossilizados de algas diatomáceas, contendo uma porosidade elevada que é ideal para leitos filtrantes, uma vez que o líquido passa pelo leito enquanto as partículas suspensas não o conseguem fazer. Contudo, a pesquisa de alternativas aos filtros de *kieselguhr* tem sido motivada pelas crescentes dificuldades em descartar o resíduo resultante. Outras tecnologias também disponíveis atualmente incluem os filtros de perlite, de membrana, de cartucho, de velas, de folha e de fluxo cruzado, além de uma ampla gama de preparações de enzimas comerciais para adicionar à cerveja com o objetivo de melhorar a sua filtração [22].

O sucesso desta etapa é influenciado pela técnica de filtração escolhida, mas também pela presença de substâncias em suspensão (como leveduras e proteínas) ou dissolvidas na cerveja (como as glucanas) e de substâncias no estado coloidal. Por exemplo os géis coloidais, como o gel de β -glucanas, resultam numa colmatação dos filtros mais rápida [7].

No final desta etapa, a determinação da turbidez da cerveja pode ser efetuada com recurso a equipamentos como o turbidímetro. Este equipamento mede a concentração de material sólido em suspensão, a partir da deteção da luz que é dispersa pela amostra quando nela se faz incidir um feixe de radiação luminosa. O resultado dessa determinação pode ser expresso em várias unidades, sendo as mais comuns as unidades EBC (do inglês *European Brewery Convention*) e FTU (do inglês *Formazine Turbidity Unit*), que estão relacionadas entre si da seguinte forma: 1 FTU = 0,25 EBC [7].

3.9. Carbonatação

A carbonatação da cerveja é uma etapa muito importante uma vez que o CO₂ dissolvido no produto, além de contribuir para a perceção do corpo e de aumentar o potencial de formação e estabilização da espuma, também atua como um intensificador de sabor e desempenha ainda um papel importante na extensão do prazo de validade do produto. Por este motivo, a sua

concentração na cerveja deve ser cuidadosamente controlada, de forma a assegurar que os consumidores possam ingerir um produto de qualidade [27]. Quanto à solubilidade do CO₂ na cerveja, sabe-se que essa propriedade é afetada pela temperatura, pela pressão e pela composição da cerveja, aumentando com a diminuição da temperatura e/ou com o aumento da pressão [22]. Assim, no que diz respeito aos métodos empregues para carbonatação da cerveja, antes de existirem equipamentos e métodos para recuperar, purificar e reutilizar o CO₂ produzido pelas leveduras durante a fermentação, a cerveja era carbonatada através da retenção desse gás no tanque de fermentação [22]. Outra forma tradicional de carbonatação é denominada *kräusenig* e consiste em adicionar à cerveja já fermentada um volume do mosto da mesma receita ainda no início da fermentação; desta forma as leveduras podem realizar uma segunda fermentação cujo principal objetivo não é originar etanol mas sim CO₂ que irá permitir a carbonatação do produto final. Um terceiro método que surgiu antes do advento da carbonatação artificial é o do condicionamento ou refermentação em garrafa; também consiste em promover uma segunda fermentação com o principal objetivo de originar CO₂, mas agora através da adição de açúcares fermentáveis (como glucose, dextrose e açúcar invertido) ao produto final, normalmente já em garrafa [27].

Apesar disto, atualmente a carbonatação é efetuada principalmente por métodos mecânicos com CO₂ recuperado dos fermentadores, posteriormente purificado com carvão ativado, liquefeito e armazenado até ser necessário ou, mais frequentemente, com CO₂ comprado a fornecedores de gases industriais próprios para aplicação na área alimentar. De entre as técnicas de carbonatação mecânica destacam-se a injeção em linha e a injeção em tanque. Na primeira, o gás é injetado no produto durante a sua transferência, por exemplo do filtro, para um tanque pressurizado de armazenamento final, onde um difusor ou uma placa porosa de aço inoxidável produzem pequeníssimas bolhas de CO₂ que são facilmente absorvidas pela cerveja. Na segunda, o gás é injetado na cerveja através de uma ou mais pedras de carbonatação localizadas no fundo do tanque, as quais formam pequenas bolhas de CO₂ que se dissolvem prontamente no produto, até que se atinja uma contrapressão. Uma vantagem da carbonatação em tanque é que esta permite a remoção de aromas desagradáveis presentes na cerveja, se o tanque puder ser aberto para a atmosfera durante a primeira parte do processo [22, 27, 28].

3.10. Enchimento para garrafa

Nas cervejarias, o enchimento da cerveja fresca para garrafa de vidro é, normalmente, efetuado em máquinas próprias que se baseiam no princípio de carrossel rotativo. Nesse caso,

geralmente os produtos são bem protegidos da oxidação: a cerveja proveniente dos tanques pressurizados é transferida para um tanque de menor dimensão, localizado na própria máquina enchedora, onde cada garrafa previamente lavada é posicionada sob uma cabeça de enchimento, é-lhe retirado todo o ar por um sistema de vácuo e de seguida é-lhe aplicada uma contrapressão com CO₂, iniciando-se então o enchimento da garrafa propriamente dito, com o produto a descer do tanque para o seu interior por gravidade. A garrafa cheia é libertada da cabeça de enchimento e rapidamente transportada para a máquina capsuladora que lhe coloca uma carga de metal, de modo a evitar oxidação, descarbonatação e eventual contaminação por contacto com o ar. Um enchimento asséptico é mais seguro se forem usadas garrafas de polietileno tereftalato (PET) [7].

3.11. Pasteurização

Após o enchimento para garrafa, lata ou barril, a cerveja pode ser pasteurizada antes de ser comercializada, para adquirir maior segurança e estabilidade microbiológica. A pasteurização consiste num aquecimento moderado do produto, até temperaturas inferiores a 100 °C, e num subsequente arrefecimento do mesmo, com o principal objetivo de interromper a atividade enzimática e destruir as células vegetativas patogénicas; não visa eliminar microorganismos não patogénicos nem esporos [29]. Uma desvantagem deste tipo de processamento é que, devido ao aquecimento que lhe está inerente, também pode prejudicar as propriedades sensoriais e nutricionais dos alimentos, apesar de ser consensual que as temperaturas mais elevadas durante períodos de tempo mais curtos causam menos danos que as temperaturas mais baixas durante períodos de tempo mais longos [29]. A designação utilizada para quantificar este tratamento térmico é a unidade de pasteurização (UP), sendo que uma UP corresponde ao grau de pasteurização que se obtém quando o produto é aquecido a uma temperatura de 60 °C durante 1 minuto. Assim, segundo Glevitzky *et al.* (2007), e conforme citado por Eksiri *et al.* (2014), a quantidade de UP's a aplicar a um produto alimentar está largamente dependente da natureza desse produto e do tipo de células que se pretendem eliminar [29], bem como da embalagem e do prazo de validade que se lhe pretende atribuir. A título de exemplo, demonstrou-se que uma pasteurização de 20-120 UP's é suficiente para a estabilidade de uma cerveja carbonatada, contendo álcool e lúpulo, à temperatura ambiente. Por outro lado, de acordo com os resultados do estudo efetuado por Eksiri *et al.* (2014), o número mínimo de UP's considerado como adequado para uma cerveja sem álcool é de 124 em barril, 200 em garrafa e 100 em lata [29].

Capítulo II – Participação nas atividades diárias da empresa

1. Participação nas atividades diárias da empresa

Uma grande parte do tempo de estágio foi dedicada a perceber e a contactar com aquilo que é a realidade de uma microcervejeira, através da participação regular nas atividades diárias da empresa mais relacionadas com o processo cervejeiro.

De forma generalizada, foi-me possível acompanhar o processo de fabrico para as quatro variedades da gama original, para as cinco variedades da gama de harmonização e para as duas variedades da gama Sidra. Também pude participar na produção de algumas cervejas do estilo sour, de uma cerveja à base de pão intitulada de Bread Beer, de limonadas e várias cervejas de autor. Para qualquer uma das bebidas mencionadas recorreu-se ao software *BeerSmith* [30] que indica a quantidade a adicionar de cada ingrediente, bem como as temperaturas e tempos ótimos a serem aplicados de modo a obter-se um produto com as características desejadas.

Para demonstrar o trabalho realizado na empresa, neste capítulo serão abordadas algumas das atividades relacionadas com o processo cervejeiro nas quais pude participar. Entre essas, encontram-se atividades mais gerais como a filtração, a carbonatação e a higienização dos materiais e equipamentos, mas também atividades de controlo do processo cervejeiro como a medição da viabilidade e concentração celular das leveduras recuperadas e ainda a análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba.

1.1. Procedimentos

Neste ponto do Capítulo II serão descritos os principais procedimentos adotados na empresa, aquando da realização da filtração, carbonatação e higienização dos materiais e equipamentos, bem como aquando da medição da viabilidade e concentração celular das leveduras recuperadas e da análise de alguns parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba.

1.1.1. Filtração

Ao longo do estágio na Essência d’Alma, Lda, a filtração dos produtos foi realizada exclusivamente através de filtros de cartucho (Figura 14). Antes de se dar início a esta etapa propriamente dita, foi necessário garantir dois aspetos: 1) existência de uma cuba livre, previamente limpa e desinfetada como será descrito mais à frente, de modo a que o produto filtrado pudesse ser-encaminhado para a mesma sem qualquer risco de contaminação, e 2)

existência de um diferencial de pressão (de aproximadamente 2 bares) entre a cuba contendo o produto não filtrado e a cuba livre, de modo a que o respetivo produto pudesse fluir da primeira em direção à segunda. Reunidas estas condições, o sistema de filtração (Figura 15) foi montado entre a cuba de saída e a cuba de receção, colocando-se no início um filtro com malha de maior dimensão (5 μm) e no final um filtro com malha de dimensão inferior (1 μm). Estando o sistema devidamente montado, abriu-se a válvula da cuba de saída que estava ligada ao primeiro filtro e, de seguida, a válvula da cuba de receção que estava ligada ao último filtro. Estas duas válvulas foram abertas lentamente para evitar que a grande velocidade da cerveja ao longo do sistema de filtração resultasse numa rápida colmatção dos filtros.



Figura 14: Filtros de cartucho utilizados para filtração dos produtos na empresa.

Enquanto a filtração decorria, o escape de gases da cuba de receção permaneceu aberto e a cuba de saída esteve permanentemente a receber Freshline (uma mistura de CO_2 e N_2) para se manter com uma pressão de 2 bares, garantindo-se assim o diferencial de pressão necessário ao fluxo da cerveja entre as duas cubas. Com o intuito de se perceber se a filtração continuava a decorrer ou se tinha parado devido à colmatção dos filtros, foi-se visualizando a altura da cerveja no nível das duas cubas; se essa altura continuasse a diminuir na cuba de saída e a aumentar na de receção, significava que os filtros não estavam colmatados; por outro lado, se essa altura não variasse dentro de um período aproximado de 15 minutos, as cubas eram fechadas e o sistema de filtração era desmontado para lavagem dos filtros. Para efetuar essa lavagem, encheu-se o interior de cada filtro com o produto Mida Foam 193, aguardou-se 2-3 minutos e de seguida fez-se circular água corrente em abundância através dos mesmos, no sentido contrário ao do fluxo da cerveja; ao fazer isso, nos casos em que o fluxo de água foi elevado, o filtro foi novamente utilizado, mas nos casos em que esse fluxo foi reduzido, o respetivo filtro foi descartado e substituído por um novo com uma malha da mesma dimensão. Posto isso, montou-se novamente o sistema de filtração e prosseguiu-se com essa etapa tal

como se tinha feito anteriormente, até o produto na cuba de saída ter acabado, e à cuba de receção ter começado a chegar apenas ar.



Figura 15: Sistema de filtração utilizado na empresa.

1.1.2. Carbonatação

No início da história desta empresa, o CO₂ resultante da fermentação alcoólica era aproveitado para carbonatação natural dos seus produtos, não pela refermentação em garrafa mas sim pela retenção desse gás na cuba de fermentação. No entanto, a determinada altura percebeu-se que, se se deixasse o escape de gases aberto, tanto durante a fermentação como durante a maturação, carbonatando-se posteriormente o produto com CO₂ inerte, a bebida final apresentava menos *off-flavours*, nomeadamente a enxofre.

Assim, durante o estágio subjacente a esta dissertação, todas as bebidas fabricadas na Essência d'Alma, Lda, foram carbonatadas exclusivamente com CO₂ inerte próprio para aplicação na área alimentar. Uma vez que a solubilidade desse gás aumenta com a diminuição da temperatura e/ou com o aumento da pressão, começou-se por injetá-lo diretamente na cuba que continha o produto a baixa temperatura (1-3 °C), até a pressão da mesma atingir 1 bar. Alcançadas essas condições, montou-se o sistema de carbonatação, sendo este um sistema fechado no qual o produto saía da cuba por gravidade e entrava numa bomba que o empurrava de volta à mesma cuba; à saída da bomba havia injeção do CO₂ no produto (Figura 16). Sendo o gás injetado na bebida durante a sua transferência para a cuba de armazenamento final, o procedimento descrito pode ser considerado uma adaptação das usuais técnicas de carbonatação mecânica por injeção em linha.



Figura 16: Sistema de carbonatação utilizado na empresa.

1.1.3. Higienização dos materiais e equipamentos

Uma atividade que, contrariamente à filtração e à carbonatação, não faz parte do processo de fabrico de cerveja propriamente dito, mas é fundamental para que esse ocorra sem constrangimentos, garantindo a obtenção de um produto final de qualidade superior e com maior segurança microbiológica, é a correta higienização de todos os materiais e equipamentos envolvidos nesse fabrico.

Na empresa, a higienização das panelas de brassagem e filtração, do Whirlpool, do permutador de placas, das cubas de fermentação e maturação, bem como das máquinas enchedoras de garrafas e barris, foi efetuada por um processo denominado CIP (do inglês *clean in place*), que consiste em limpar as superfícies interiores dos equipamentos e os respetivos acessórios sem necessidade de se proceder à desmontagem dos mesmos. Entre as principais vantagens deste método de higienização destacam-se o menor consumo energético bem como o menor consumo de água, detergentes e desinfetantes, dado haver uma recirculação das soluções de limpeza e desinfecção em circuito fechado.

Para a concretização do CIP seguiram-se as seguintes etapas gerais: 1) enxaguamento do equipamento com água a cerca de 90 °C para remoção da sujidade maior; 2) recirculação do detergente alcalino Mida Flow 110, diluído de 2:50 com água a cerca de 60 °C, para remoção

da sujidade e resíduos orgânicos; 3) enxaguamento do equipamento com água à temperatura ambiente para remoção do detergente; 4) recirculação do desinfetante Mida Chriox 5 à base de ácido peracético (mistura em equilíbrio de peróxido de hidrogénio, ácido acético e água) diluído de 1:50 com água à temperatura ambiente, para eliminação da carga microbiana; e 5) enxaguamento do equipamento com água à temperatura ambiente para remoção de qualquer vestígio dos produtos químicos de limpeza e desinfeção. As primeiras três etapas deste procedimento de CIP foram efetuadas logo após a utilização das respetivas máquinas e/ou equipamentos, enquanto as duas últimas foram efetuadas o mais próximo possível de cada nova utilização de modo a evitar contaminação microbiológica. Por vezes, sobretudo no CIP das cubas e panelas, após as etapas descritas, também se promoveu a recirculação do desincrustante Mida Flow 210 à base de ácido nítrico, diluído de 1:50 com água à temperatura ambiente, para retirar a pedra de cerveja incrustada no interior do equipamento, seguindo-se um enxaguamento com água em abundância para remover qualquer vestígio desse produto.

Quanto aos barris de inox, antes de serem reutilizados eles também foram higienizados com o detergente Mida Flow 110, diluído de 2:50 com água a 50-60 °C, e com o desinfetante Mida Chriox 5, diluído de 1:50 com água à temperatura ambiente, mas numa máquina própria para lavagem deste tipo de barris. Para a higienização dos filtros de cartucho utilizou-se o desinfetante Mida Foam 193, e para uma rápida desinfeção tanto das entradas das cubas como de alguns acessórios mais pequenos (cabeçotes, colheres, tampas, bacias, copos, balanças), estes foram borrifados com o desinfetante Mida San 311 à base de álcool etílico e posteriormente enxaguados antes de serem utilizados.

Todos os produtos de limpeza e desinfeção acima mencionados foram fornecidos pela empresa Christeyns, sendo próprios para uso na indústria alimentar.

1.1.4. Determinação da viabilidade e concentração das leveduras recuperadas

Apesar de no final da maturação haver a possibilidade de recuperar as leveduras, da cuba de maturação para recipientes próprios, e de as armazenar a baixa temperatura até ao dia de uma nova produção em que as mesmas possam ser reinoculadas no mosto por fermentar, as sucessivas recuperações e reinoculações dessas células resultam na sua deterioração gradual, o que por sua vez pode reduzir o sucesso da fermentação subsequente [31]. Sendo a fermentação uma etapa crucial do processo cervejeiro, a determinação da viabilidade e concentração das leveduras recuperadas antes das mesmas serem reinoculadas, reveste-se de grande importância.

Na empresa, essa determinação foi efetuada por contagem num microscópio ótico (Omegon), com recurso à câmara de contagem de Neubauer (Zuzi) e ao corante azul-de-metileno 1,5 % (Sigma-Aldrich). Para tal, começou-se por recolher uma amostra da suspensão

de leveduras contida num dos recipientes armazenados, diluiu-se essa amostra (geralmente de 1:100) com água e adicionaram-se 4-5 gotas do corante azul de metileno. Após se agitar muito bem para homogeneizar, transferiu-se uma alíquota da solução resultante para a câmara de contagem de Neubauer, de modo a preencher todo o espaço entre os dois canais laterais da mesma, colocou-se uma lamela sobre essa câmara (o que deixou uma altura de 0,10 mm da câmara à lamela) e observou-se ao microscópio ótico. Na fase seguinte, contou-se o número de células vivas e mortas em cada um dos quadrados salientados a laranja na Figura 17.

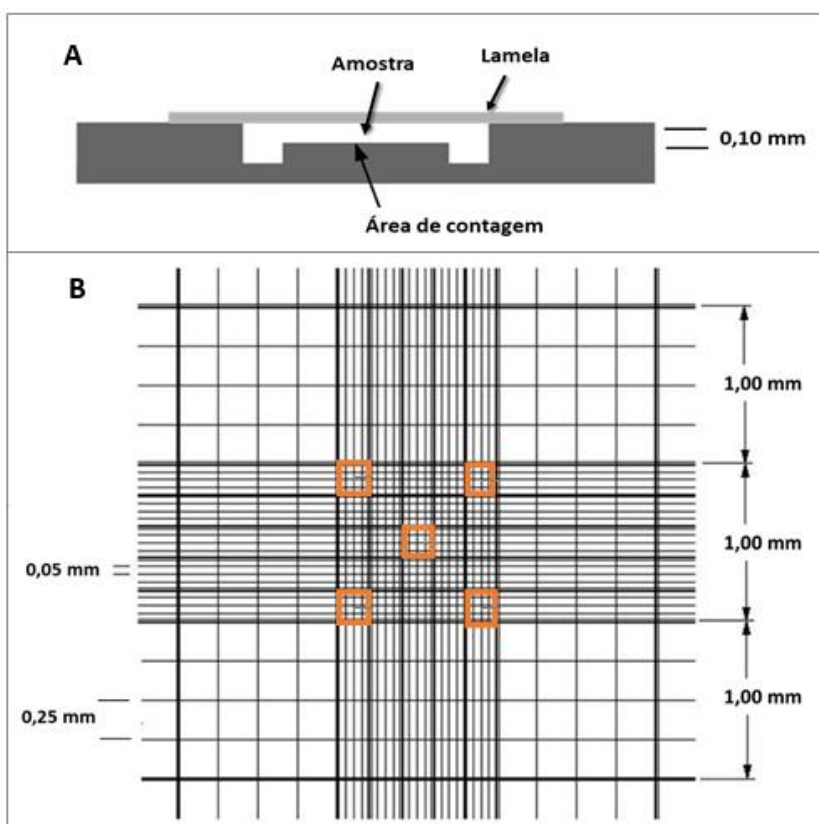


Figura 17: Vista lateral (A) e frontal (B) da zona de contagem da câmara de Neubauer, estando salientados a laranja os quadrados alvo de contagem ao microscópio ótico. Adaptado a partir de [32].

A distinção e posterior contagem de cada tipo de células (vivas e mortas) através deste método foi possível pelo facto de ser ter utilizado o corante vital azul de metileno. Quando as células estão imersas numa solução com esse corante, as enzimas ativas das células vivas reduzem o azul de metileno a um composto incolor, enquanto as enzimas inativas das células mortas não são capazes de o fazer. Por este motivo, as células vivas surgem incolores enquanto as células mortas assumem uma cor azul quando vistas ao microscópio ótico. Assim, a percentagem de células incolores dá-nos uma estimativa da percentagem de células vivas. Contudo, algumas células vivas podem possuir as enzimas responsáveis pela redução do azul

de metileno inativas ou desnaturadas, corando de azul, enquanto algumas células que já não se reproduzem podem ainda possuir essas enzimas ativas, surgindo incolores, e isso levará à obtenção de resultados incorretos [33].

Posteriormente, tendo em conta o número total de células vivas e mortas contado, bem como o fator de diluição (fd) aplicado à amostra da suspensão de leveduras e o volume acima de cada quadrado da câmara de contagem (0,25mm x 0,25mm x 0,10mm = 0,0063 mm³), determinou-se a viabilidade celular (% de células vivas) e a concentração celular (nº de células vivas/ L da suspensão original), de acordo com as Equações 2 e 3, respetivamente.

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

(Equação 2)

$$\text{Concentração de células vivas na suspensão original (n}^{\circ} \text{ de células vivas/L)} = \frac{n^{\circ} \text{ células vivas contadas}}{n^{\circ} \text{ quadrados contados} \times \text{volume cada quadrado (mm}^3\text{)} \times 10^{-6}} \times fd$$

(Equação 3)

Estando os valores de viabilidade celular acima do limite mínimo estipulado pela empresa (cerca de 65 %), a suspensão de leveduras recuperadas foi transferida para um ou mais barris e inoculada no mosto por fermentar, com uma grande quantidade de oxigénio, para garantir o metabolismo aeróbio e subseqüentemente uma elevada multiplicação dessas células numa fase anterior à fermentação propriamente dita. Quanto ao volume de suspensão de leveduras inoculado, desde que os valores de viabilidade e concentração celular se encontrassem dentro da gama definida pela empresa, em produções de 1000 L inoculou-se um volume de 30-50 L de levedura recuperada, e em produções de 2000 L inoculou-se um volume de 50-80 L de levedura recuperada, também dependendo do tipo de cerveja.

1.1.5. Análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba

Desde a inoculação das leveduras no mosto por fermentar, até ao último dia de fermentação, todos os produtos em cuba foram regularmente submetidos a um conjunto de análises físico-químicas, para uma monitorização e um controlo mais rigorosos da evolução da fermentação. Os parâmetros físico-químicos analisados foram o pH, o teor de sólidos solúveis

e o potencial alcoólico, sendo que a partir deste último ainda foi possível determinar a percentagem de atenuação do mosto.

A determinação do pH foi efetuada por potenciometria, com recurso a um eletrodo de pH digital edge® (HI10480 da marca Hanna Instruments) com sensor de temperatura incorporado. Em cada análise, o eletrodo de pH, previamente calibrado com soluções tampão de pH 3,00, 7,01 e 10,0, foi mergulhado na amostra a ser analisada, até cobrir completamente a sua junção, aguardou-se cerca de 1 minuto e anotou-se o valor de pH indicado no mostrador quando este estabilizou por pelo menos 3 segundos. Para cada amostra, foram efetuadas pelo menos duas medições de pH, aceitando-se o primeiro valor obtido que foi igual em duas medições consecutivas. Entre cada duas amostras e no final desta análise, o eletrodo foi lavado com água em abundância para remover todas as manchas.

A determinação do teor de sólidos solúveis totais (em ° Brix), como estimativa da quantidade de açúcares ainda presentes, foi realizada através da leitura direta num refratómetro digital portátil (HI96813 da marca Hanna Instruments), um instrumento ótico que se baseia na medição do índice refrativo de uma solução. Estando o aparelho previamente calibrado com água destilada, com o auxílio de uma pipeta de plástico encheu-se o recipiente destinado à amostra com aproximadamente 4 gotas da amostra a ser analisada e, após se pressionar a tecla READ, anotou-se o valor de ° Brix indicado no mostrador. Para cada amostra analisada foram efetuadas pelo menos duas medições, aceitando-se o primeiro valor obtido que foi igual em duas medições consecutivas.

Para além da medição do teor de sólidos solúveis, o refratómetro HI96813 também é capaz de estimar o teor de álcool no produto final, com base no teor de açúcares ainda presentes no mosto, o que é conhecido como álcool potencial ou álcool provável pelo facto de a conversão entre os açúcares e o álcool estar dependente de diversos fatores. Assim, a determinação do potencial alcoólico (em % vol/vol) foi efetuada no mesmo refratómetro que a determinação do teor de sólidos solúveis, pressionando-se apenas a tecla RANGE após o valor de °Brix aparecer no mostrador. Também neste caso, para cada amostra analisada foram efetuadas duas ou mais medições do potencial alcoólico, aceitando-se o primeiro valor obtido que foi igual em duas medições consecutivas.

Entre cada duas amostras e no final de todas as análises de teor de sólidos solúveis e potencial alcoólico pretendidas, o recipiente do refratómetro que conteve as amostras foi seco com um tecido macio, enxaguado com água destilada e novamente seco com um tecido macio.

A partir dos valores encontrados para o potencial alcoólico, e através da Equação 4, ainda foi possível determinar a percentagem de atenuação do mosto, sendo este um parâmetro que traduz a extensão da fermentação. Para tal recorreu-se à Equação 4, em que *Potencial alcoólico*

dia 1 corresponde ao potencial alcoólico determinado no dia de inoculação das leveduras no mosto, *Potencial alcoólico dia x* corresponde ao potencial alcoólico determinado no dia *x* após inoculação das leveduras no mosto, e *Potencial alcoólico limite* corresponde ao potencial alcoólico mais baixo que se poderá conseguir obter para aquele tipo de cerveja. O potencial alcoólico limite foi determinado na empresa, para cada tipo de cerveja, colocando-se o mosto dessa cerveja numa garrafa com excesso de levedura e deixando-se a 20 °C até a fermentação terminar.

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

(Equação 4)

1.2. Resultados e sua interpretação

Neste ponto do Capítulo II serão apresentados os resultados dos procedimentos descritos no ponto anterior, bem como uma interpretação dos mesmos.

1.2.1. Filtração

A forma mais rigorosa e eficaz de controlar a filtração, seria através da medição da turbidez dos produtos em três momentos distintos: antes, durante e após a sua filtração estar concluída. Contudo, dada a inexistência de equipamentos adequados para efetuar essa medição, tal não foi possível. Assim, na empresa, a única forma de controlo desta etapa consistiu na análise visual dos produtos, antes e depois dos mesmos serem filtrados como se descreveu anteriormente. Apesar de todas as bebidas se terem mostrado mais límpidas após esse processo, essa foi apenas a opinião dos operadores, não existindo valores concretos (analíticos) que o comprovem.

No futuro, a potencial aquisição de um turbidímetro irá possibilitar uma monitorização mais rigorosa do decorrer da filtração, o que por sua vez permitirá otimizar a carga de alimentação do filtro e evitar a obstrução ou entupimento do mesmo, entre outros aspetos, melhorando a qualidade dos produtos.

1.2.2. Carbonatação

Como a empresa não dispunha de um aparelho para medição do CO₂ dissolvido, o controlo deste processo foi efetuado através da prova de amostras que iam sendo retiradas da

cuba, por uma torneira de prova. No entanto, esta forma de monitorização e controlo do processo é muito pouco rigorosa, uma vez que está dependente da opinião de um ou poucos (geralmente três) provadores.

No geral, considerou-se que a maioria das bebidas estavam carbonatadas, três a cinco horas depois desse processo ter inico, momento esse em que a pressão na respetiva cuba rondava os 2,5 bares.

1.2.3. Determinação da viabilidade e concentração das leveduras recuperadas

Em cada análise efetuada, a utilização do corante azul de metileno permitiu distinguir facilmente as células mortas das células vivas (Figura 18), possibilitando assim a contagem desses dois tipos de células.

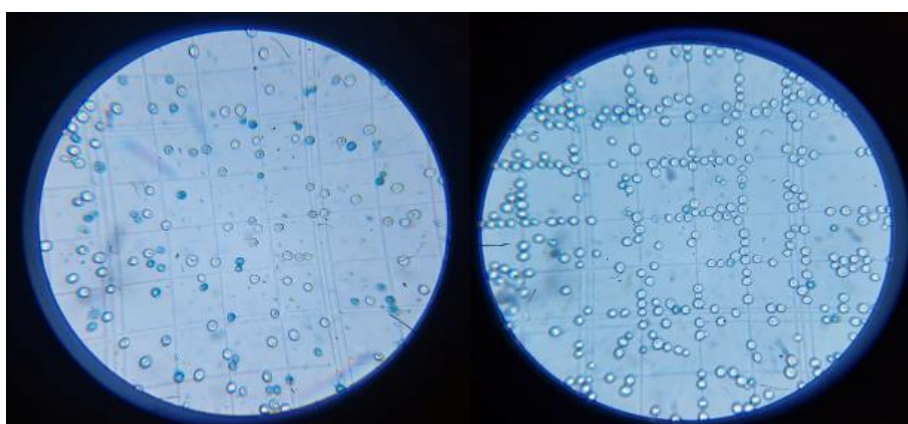


Figura 18: Análise microscópica de duas amostras de leveduras recuperadas, sujeitas ao mesmo fator de diluição.

Os resultados analíticos das medições da viabilidade (% de células vivas) e concentração celular (nº de células vivas/ L da suspensão original) das leveduras recuperadas, obtidos a partir das Equações 2 e 3, respetivamente, e relativos a um mês de análise, encontram-se reunidos na Tabela 4.

A partir da análise dos valores presentes nessa tabela, é possível perceber que no dia 3 se efetuou a primeira produção do mês de Abril, com uma cerveja do estilo lager. Assim, após se verificar a origem da levedura recuperada armazenada no frio, optou-se por analisar a viabilidade e a concentração celular daquela que havia sido recuperada no final da maturação da cerveja de autor denominada Grande Birra (lote B023GB) para um único bidão plástico de 30 L e no final da maturação da Vadia Loira (lote B019LL) para quatro bidões de 30 L, pelo facto de tanto a Grande Birra como a Vadia Loira serem cervejas do estilo lager. Atendendo aos valores de viabilidade e concentração celular obtidos, a levedura recuperada da Grande Birra e a recuperada da Vadia Loira para os bidões 1 e 2 foi transferida para um barril de inox

com uma capacidade de 50 L, até perfazer o volume total desse barril, e reinoculada no novo mosto por fermentar. Já a levedura recuperada do mesmo lote da Vadia Loira para os bidões 3 e 4 foi descartada, essencialmente por apresentar uma percentagem de viabilidade celular inferior ao limite mínimo estipulado pela empresa (aproximadamente 65 %), que poderia conduzir a uma fermentação mais lenta e ao stress dessas células por não serem capazes de atenuar o mosto, isto é, converter todos os seus açúcares fermentáveis em etanol e CO₂.

No dia 4 de Abril foi efetuada a segunda produção do mês, também com uma cerveja do estilo lager. Para esta, optou-se por analisar a viabilidade e concentração celular da levedura que havia sido recuperada no final da maturação da Vadia Nautika (lote B026BP) para um único bidão de 30 L. Atendendo aos valores obtidos, toda a levedura contida nesse recipiente foi transferida para um barril de inox de 50 L, até perfazer o volume total desse barril, e reinoculada num novo mosto por fermentar.

Nos restantes dias de produção (16, 18, 23 e 24) que se seguiram ao longo do mesmo mês, procedeu-se de forma semelhante, sendo que todas as leveduras recuperadas analisadas apresentaram valores de viabilidade acima do limite mínimo estipulado pela empresa e por isso foram reinoculadas nos mostos por fermentar produzidos nos respetivos dias.

Apesar deste método de análise ser relativamente simples e fácil de aplicar, ele apenas permitiu distinguir as células vivas das células mortas (viabilidade), e não as células metabolicamente funcionais das não funcionais (vitalidade). Uma vez que a fermentação só pode ser realizada por leveduras viáveis e metabolicamente ativas, e que algumas das células contabilizadas como viáveis podem já ter perdido a sua capacidade fermentativa, a determinação da vitalidade das leveduras recuperadas poderia ajudar a tomar melhores decisões quanto às leveduras inoculadas no mosto por fermentar. Atualmente, um dos métodos mais utilizados para fazer essa análise é o ensaio de acidificação do meio. Além dos métodos para controlo da viabilidade e vitalidade das leveduras, procedimentos para deteção de contaminantes microbianos também seriam adequados para garantir um controlo mais rigoroso da qualidade das leveduras recuperadas, antes da sua reinoculação num mosto cervejeiro [34].

Tabela 4: Resultados das medições de viabilidade (% de células vivas) e concentração celular (nº de células vivas/ L da suspensão original), efetuadas durante o mês de Abril, às amostras das suspensões de leveduras previamente recuperadas e armazenadas a baixa temperatura. Nota: fd corresponde ao fator de diluição aplicado à amostra da suspensão de leveduras.

Dia do mês de Abril	Origem	fd	Células mortas contadas	Células vivas contadas	Viabilidade celular (%)	Concentração celular (células vivas/ L suspensão original)
3	Grande Birra B023GB	100	13	180	93,26	9,00 x 10 ¹¹
	Loira B019LL (Bidão 1)	100	28	70	71,43	3,50 x 10 ¹¹
	Loira B019LL (Bidão 2)	100	29	63	68,48	3,16 x 10 ¹¹
	Loira B019LL (Bidão 3)	100	35	59	62,77	2,96 x 10 ¹¹
	Loira B019LL (Bidão 4)	100	69	110	61,45	5,14 x 10 ¹¹
4	Nautika B026BP	50	14	265	94,98	6,63 x 10 ¹¹
16	Loira B029LL	50	82	248	75,15	6,20 x 10 ¹¹
18	Preta B030LP	100	16	114	87,69	5,70 x 10 ¹¹
23	Trigo B022TB (Bidão 1)	50	26	307	92,19	7,68 x 10 ¹¹
	Trigo B022TB (Bidão 2)	50	24	391	94,22	9,78 x 10 ¹¹
24	Loira B032LL	50	32	397	92,54	9,93 x 10 ¹¹

1.2.4. Análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba

Ao longo da fermentação, os produtos em cuba foram analisados quanto ao seu pH, teor de sólidos solúveis (em °Brix) e potencial alcoólico (em % vol/vol). Os resultados dessas medições para dois tipos de cerveja, uma lager (Vadia Rubi) e uma ale (Vadia Trigo), ambas produzidas no mês de Março, encontram-se reunidos nas Tabelas 5 e 6, respetivamente

A partir da análise dos valores reunidos na Tabela 5, é possível verificar que ao longo da fermentação do mosto da Vadia Rubi produzido a 13 de Março, tanto o pH como o teor de sólidos solúveis e o potencial alcoólico do produto foram diminuindo, até estabilizarem num determinado valor, que foi de 4,40 para o pH, de 7,8 para o teor de sólidos solúveis e de 4,3 para o potencial alcoólico. Esta diminuição progressiva dos três parâmetros era esperada, uma vez que ao longo da fermentação os açúcares do mosto estão a ser convertidos noutros produtos (por isso o teor de sólidos solúveis diminui). Como um dos produtos que resulta da fermentação dos açúcares é o CO₂, ao longo dessa etapa o teor de CO₂ dissolvido no produto aumenta e, conseqüentemente, o seu pH diminui. Além disso, sendo o etanol outro produto resultante da fermentação dos açúcares, à medida que a fermentação prossegue, o potencial para se formar ainda mais etanol a partir dos açúcares ainda presentes (que são cada vez menos) é cada vez menor, logo o potencial alcoólico do produto diminui. O facto de os três parâmetros estabilizarem praticamente em simultâneo, em torno de um dado valor, significa que a composição do produto em termos de açúcares, etanol e CO₂ já não se está a alterar e, portanto, a fermentação parou.

Ainda da análise da mesma tabela, pode-se perceber que a atenuação do mosto atingiu os 50 % no fim de semana (dias 16 e 17), o que levou a concluir que aproximadamente metade do teor de açúcares presentes no mosto foram fermentados até esse fim de semana. Dessa forma, na segunda-feira seguinte (dia 18) efetuou-se uma purga de levedura (Figura 19), isto é, removeu-se parte das leveduras depositadas no fundo do mosto, e no controlo de temperatura da respetiva cuba alterou-se o *set point* para o valor estipulado pela empresa para a segunda metade da fermentação em cervejas lager. No dia 22, a atenuação do produto havia estabilizado em torno dos 81 %, pelo que se considerou que a fermentação havia parado e, por isso, efetuou-se outra purga de levedura e alterou-se novamente o *set point* da cuba, agora para o valor estipulado pela empresa para a maturação.

Para todas as outras cervejas do estilo lager, procedeu-se exatamente da mesma forma.

À semelhança do que foi descrito para a Vadia Rubi, a análise dos valores reunidos na Tabela 6 revela que, tanto o pH como o teor de sólidos solúveis e o potencial alcoólico do mosto da Vadia Trigo produzido a 14 de Março, foram diminuindo ao longo da fermentação, até estabilizarem num determinado valor, que neste caso foi de 4,10 para o pH, de 6,1 para o teor de sólidos solúveis e de 3,3 para o potencial alcoólico. Também aqui a atenuação do mosto alcançou os 50 % no fim de semana (dias 16 e 17), efetuando-se uma purga de levedura no dia seguinte, e estabilizou em torno de 88 % no dia 22, quando se fez a última purga de levedura para esta cerveja e se alterou o *set point* da cuba para o valor estipulado para a maturação. Neste caso, só não foi necessário alterar o *set point* da cuba, da primeira para a

segunda metade da fermentação, por estar definido pela empresa que a fermentação das cervejas ale ocorre sempre à mesma temperatura.

Para todas as outras cervejas do estilo ale, procedeu-se exatamente da mesma forma.

De notar que cada purga de levedura efetuada, a meio e no final de uma fermentação, teve por objetivo a remoção da camada de leveduras sedimentadas no fundo do mosto/cerveja, por se considerar que essa camada seria essencialmente constituída por células mortas que, não sendo removidas, poderiam romper e promover o desenvolvimento de *off-flavours*.

Tabela 5: Resultados das análises físico-químicas efetuadas à cerveja Vadia Rubi (lager), produzida durante o mês de Março, e respetiva percentagem de atenuação.

	Dia do mês de Março									
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
pH	—	4,85	4,65	Fim de semana		4,35	4,35	4,38	4,40	4,40
Teor de sólidos solúveis (°Brix)	14,1	13,2	13,1			8,9	8,0	7,9	7,8	7,8
Potencial alcoólico (% vol/vol)	7,8	7,2	7,2			4,9	4,4	4,4	4,4	4,3
Atenuação (%)	0	13,95	13,95			67,44	79,07	79,07	81,40	81,40

Tabela 6: Resultados das análises físico-químicas efetuadas à cerveja Vadia Trigo (ale), produzida durante o mês de Março, e respetiva percentagem de atenuação.

	Dia do mês de Março									
	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
pH	—	4,43	Fim de semana		4,12	4,13	4,13	4,11	4,10	
Teor de sólidos solúveis (° Brix)	13,0	9,5			6,5	6,0	6,1	6,1	6,1	
Potencial alcoólico (% vol/vol)	7,1	5,2			3,5	3,3	3,4	3,4	3,3	
Atenuação (%)	0	44,19			83,72	88,37	86,05	88,37	88,37	



Figura 19: Remoção da levedura do mosto, através de uma purga de levedura.

Capítulo III – Desenvolvimento de um Novo Produto Alimentar

1. A importância dos novos produtos alimentares

Um produto alimentar pode ser novo para o mercado, quando ainda não foi apresentado em nenhum mercado de nenhum local, ou pode ser simplesmente novo para a empresa, quando essa empresa ainda não o vendeu antes, mas outras já o fizeram. A última tipologia de produtos é bastante mais frequente e pode constituir uma novidade para uma empresa por vários aspetos: (1) são produtos que nunca foram fabricados ou distribuídos por ela; (2) são produtos que já foram fabricados por ela mas que são agora introduzidos numa nova área geográfica; (3) são produtos que já foram fabricados por ela mas que são agora introduzidos num novo nicho de mercado, isto é, com uma nova função; ou (4) são produtos que já foram fabricados por ela mas que são agora apresentados com uma nova embalagem, um novo rótulo, um novo tamanho ou um novo formato [1].

Segundo Aramouni (2014), ao envolverem-se no desenvolvimento de novos produtos alimentares (DNPA), as empresas esperam conseguir conquistar novos clientes, expandir para novos mercados geográficos, aumentar os seus lucros, elevar o entusiasmo da marca e/ou aumentar as quotas de mercado [3]. De facto, o desenvolvimento de novos produtos ou a descoberta de novos usos para produtos antigos, constitui uma forma das empresas apresentarem um crescimento contínuo e prosperarem num mercado tão competitivo como o que se verifica atualmente. Se as vendas dos novos produtos conseguirem substituir as dos antigos, que já não vendem bem, esses novos produtos darão como que uma nova vida a uma empresa, pois nenhum produto consegue manter as suas vendas lucrativas ano após ano [1].

No geral, após serem desenvolvidos e lançados no mercado, os produtos alimentares seguem um ciclo de vida típico, como o que se encontra representado na Figura 20, em que o eixo horizontal é uma medida de tempo e o eixo vertical é um índice de aceitação do respetivo produto, medido como volume de vendas. Nesse ciclo de vida podem ser discriminadas quatro fases distintas. A primeira fase, *Introdução*, consiste na introdução do produto no mercado, a qual é fortemente apoiada por publicidade, promoções, cupões de desconto e demonstrações em lojas, com o principal objetivo de atrair clientes que de outra forma poderiam não experimentar esse artigo. Nesta fase os clientes e os consumidores ainda estão a ser informados acerca do novo produto e, por esse motivo, o volume de vendas ainda é muito reduzido, os custos são elevados e os retornos são mínimos. A segunda fase, *Crescimento*, traduz-se por um acentuado crescimento das vendas do produto, uma vez que os primeiros clientes começam a comprar o produto com regularidade e, ao descreverem a sua experiência a

outras pessoas, fazem publicidade que pode atrair novos clientes. Ao longo deste período, os custos diminuem e os lucros aumentam. A terceira fase, *Maturidade*, começa com um crescimento das vendas cada vez menor, até que essas vendas estabilizam, devido à fadiga do consumidor que se mostra cada vez mais indiferente face ao produto antigo e mais entusiasmado com os produtos concorrente recém-introduzidos no mercado. Neste momento as promoções não conseguem manter as vendas lucrativas e os custos passam a ser equivalentes aos lucros. Na última fase do ciclo, *Declínio*, as vendas do produto são cada vez menores, em detrimento das vendas dos produtos mais recentes. A partir deste momento, a publicidade e as promoções para tentar manter as vendas do produto deixam de ser rentáveis, e as empresas deixam de o fabricar [1, 3].

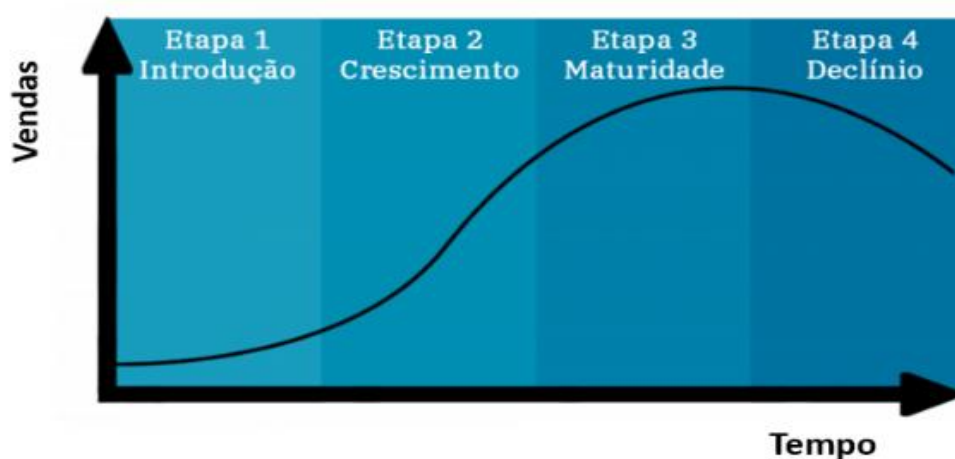


Figura 20: Ciclo de vida típico de um produto no mercado, com as suas quatro fases: 1) Introdução, 2) Crescimento, 3) Maturidade e 4) Declínio. Retirado de [35].

Ainda mais revelador do sucesso de um produto que o seu volume de vendas, é o lucro líquido trazido por essas vendas e, quanto a esse lucro, durante as duas primeiras fases do ciclo de vida ele é mínimo, permitindo apenas suportar os custos de investigação e desenvolvimento anteriores, bem como os custos com a publicidade e as promoções para obter penetração no mercado, e os custos com as exigências dos retalhistas para obter espaço nas prateleiras. Na realidade, os custos líquidos só começam a superar as despesas a partir da última parte da segunda fase do ciclo, e no final da terceira fase já começam a diminuir novamente. Desta forma, para uma empresa continuar a ter lucro líquido e a prosperar, assim que os seus produtos mais antigos atinjam a quarta fase do ciclo, ela já deve possuir novos produtos prontos para lançamento, o que requer um programa de investigação e desenvolvimento de novos produtos em constante andamento [1].

2. O processo de desenvolvimento de novos produtos alimentares

O DNPA envolve mais do que apenas criar uma receita; requer tempo e também recursos humanos e físicos que são dispendiosos, nomeadamente pessoal talentoso, investigação e planeamento extensivos e instalações físicas adequadas. Além disso, não há garantia de que os novos produtos desenvolvidos por meio desses recursos consigam gerar lucro e cobrir todas as despesas do seu desenvolvimento [1]. Na verdade, de acordo com Aramouni (2014), a taxa de falha dos novos produtos, que ocorre quando um produto deixa de estar nas prateleiras das lojas após cinco anos, pode chegar a 90 % em algumas categorias de supermercado [3].

Nas empresas de maiores dimensões, o DNPA fica normalmente a cargo de uma equipa de investigação e desenvolvimento que inclui indivíduos especializados em diversas áreas, como engenheiros da área alimentar, especialistas em regulamentação, especialistas em marketing e por vezes até os próprios clientes/consumidores, entre outros. Já as pequenas empresas podem nem ter um departamento de investigação e desenvolvimento, estando por isso muito dependentes de universidades e laboratórios independentes para criar os seus novos produtos alimentares [3].

Quanto ao tempo gasto no DNPA, geralmente este varia de 6 meses a 5 anos, dependendo do grau de inovação e das tecnologias necessárias. Por exemplo, o desenvolvimento de um novo produto que apenas requer os equipamentos que já se encontram instalados numa fábrica deverá ser muito mais rápido que o desenvolvimento de um novo produto que implique a montagem de uma linha de processamento personalizada [3].

No que diz respeito ao processo de DNPA propriamente dito, a maioria dos autores concorda que este possa ser dividido em várias fases (Figura 21), apesar de não haver total concordância entre os mesmos autores quanto ao número, ordem ou nome dessas fases.

De qualquer forma, o ponto de partida é sempre o estudo de mercado, com o objetivo de se reunir informação acerca das tendências de ingredientes, desejos e necessidades dos clientes e consumidores [1]. Aramouni (2014) sugere que os investigadores podem conseguir reunir toda essa informação de várias formas, como por exemplo através da participação em feiras, mantendo-se atualizados quanto ao lançamento de novos produtos por outras empresas, examinando artigos de investigação e monitorizando as prateleiras dos supermercados [3]. Posteriormente, com base nas tendências, desejos e necessidades identificadas, deverá ser gerada uma série de ideias para o novo produto (pela equipa de marketing, caso essa exista). Várias técnicas podem ser utilizadas para a geração de ideias, sendo a mais comum denominada de Brainstorming. O nome dessa técnica deriva do significado das palavras Brain (cérebro) e Storming (tempestade), pelo que pode ser traduzida por tempestade de ideias, e no fundo consiste em gerar o maior número possível de ideias, de forma totalmente aleatória. Na

fase seguinte deve ser feita uma triagem de todas as ideias anteriormente geradas, de forma a selecionar-se apenas a mais promissora [1, 3]. Esta é uma das etapas mais críticas num projeto de DNPA, pois levará a empresa a decidir investir tempo e dinheiro no processo de desenvolvimento de um novo produto ou a abandoná-lo por completo. Para fazer esta triagem as empresas podem começar por tentar responder a uma série de questões, tais como: *Quem vai usar o produto?*, *Como o vão usar?*, *Que preparação é necessária para o consumir?*, *De que forma é que beneficiará o consumidor?*, *Tem outros usos ou aplicações?*, *Como é que se diferencia da concorrência?*, *Onde será vendido?* e *Qual será o seu preço?* [3]. Na fase seguinte é fundamental definir o conceito do novo produto, isto é, uma versão detalhada das suas especificações bem como da tecnologia e dos recursos necessários para a sua produção, e avaliar a sua viabilidade tendo em conta aspetos tecnológicos (como os equipamentos, as instalações e os processos necessários para fabricar o novo produto), regulamentares e financeiros [3]. Nesta fase também pode ser aplicado um questionário ao público-alvo, com o objetivo de caracterizar melhor os seus hábitos de consumo e de perceber melhor a sua aceitação e as suas expectativas quanto ao novo produto [1]. Após o projeto ser aceite como viável, iniciam-se a maior parte das atividades de design e engenharia do produto; são efetuados testes de formulação, com o desenvolvimento de protótipos, e simula-se o processo de fabrico. Uma vez definida a formulação e o processo de fabrico do novo produto, este é produzido numa escala maior e, antes de ser lançado no mercado, pode ainda realizar-se um teste de mercado [1, 3].

Os testes de mercado consistem em introduzir pela primeira vez um produto no mercado, mas de forma controlada, apenas numa pequena região ou área de distribuição, com o principal objetivo de avaliar como os clientes, os consumidores, os retalhistas e a concorrência reagem face a esse novo produto [1]. Em primeiro lugar deve-se começar por escolher a localização do teste, tendo em conta que nenhuma área será capaz de representar toda a diversidade populacional existente e, por esse motivo, qualquer área escolhida introduzirá um viés que deve ser conhecido por quem vai analisar os resultados do teste [1]. Além disso, a localização do estudo também deve ter em conta o tipo de produto e o público-alvo a quem ele se destina. Normalmente, são selecionados para este efeito os futuros locais de venda do produto. Em segundo lugar, é importante trabalhar em conjunto com os gerentes das lojas para tomar decisões acerca de possíveis estratégias para despertar o interesse dos clientes e consumidores. Tais estratégias podem passar por fazer publicidade, fazer promoções, oferecer cupões de desconto ou fazer demonstrações em loja. Além disso, a própria disposição do produto dentro da loja também pode ajudar a captar a atenção de mais clientes [3]. Posto isto, é importante manter o contacto com os gerentes dos estabelecimentos onde o produto está a ser vendido,

para perceber como estão a decorrer essas vendas, mas também é importante captar o feedback imediato dos consumidores quanto áquilo que eles pensam do produto e possíveis sugestões que tenham [3]. Como facilmente se pode perceber, a realização deste tipo de estudos pode acarretar custos muito elevados, motivo pelo qual muitas empresas optam por ignorá-los e introduzir os seus novos produtos diretamente nos mercados pretendidos [1]. Contudo, estes testes deverão permitir responder a uma série de questões importantes, tais como: *Como e quando é que os consumidores usam o produto?, Os consumidores usam mal ou entendem mal o produto?, Como é que os clientes, os retalhistas e a concorrência estão a reagir ao produto?, A mensagem do produto está a ser mal interpretada?, Quão bem o produto se manteve no manuseio e na distribuição?, A embalagem é atraente para o consumidor?, O consumidor está disposto a comprar novamente o produto?*, entre outras [1], e a resposta a estas questões constitui uma oportunidade única para as empresas avaliarem como melhorar o produto antes de o lançarem formalmente no mercado em grande escala [1, 3].

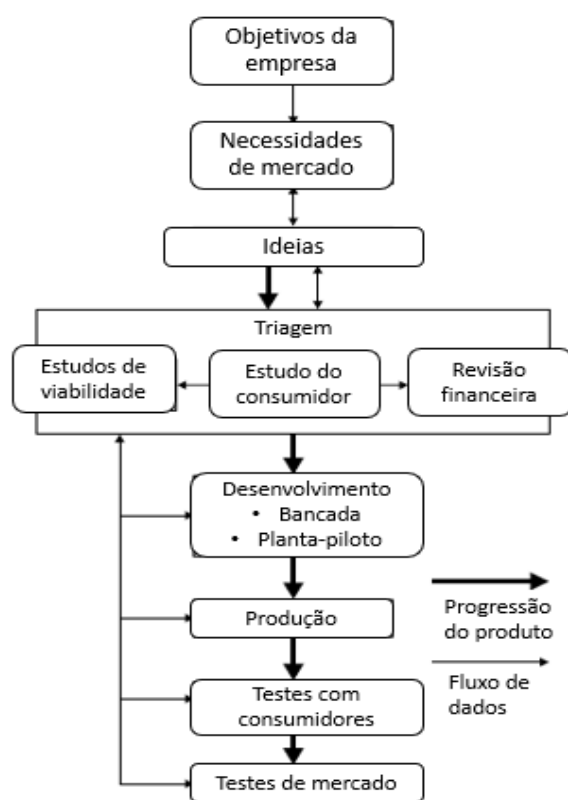


Figura 21: Fases do desenvolvimento de um novo produto alimentar.
Adaptado a partir de [1].

De salientar que o DNPA é um processo em constante evolução, frequentemente marcado por grandes mudanças, alterações e reformulações, à medida que novas informações vão

surgindo. Isso faz com que as suas fases não sejam estritamente sequenciais, apesar de, obviamente, existir algum sequenciamento [1].

3. Desenvolvimento estruturado da nova bebida

Neste ponto será descrita a forma como se procedeu para o desenvolvimento estruturado da nova bebida sem álcool. Numa primeira fase foi feita uma análise do setor alimentar em Portugal, procurando-se identificar os hábitos e tendências de consumo, bem como os desejos e as necessidades dos consumidores. Para tal, foi reunida informação de artigos científicos e de relatórios de análise de mercado, além de pesquisa em sites e lojas de comércio on-line. De seguida, tentou-se criar um conjunto de ideias que fossem ao encontro da informação anteriormente reunida e, de todas essas ideias, selecionou-se apenas a que se considerou ser mais promissora no mercado atual. Definiu-se o conceito do novo produto, e aplicou-se um questionário aos seus potenciais consumidores. Após o projeto ser aceite como viável, iniciaram-se os testes de formulação que permitiram definir a formulação do novo produto. De seguida, simulou-se, aperfeiçoou-se e definiu-se o processo de fabrico da nova bebida.

3.1. Análise do mercado alimentar em Portugal

De acordo com o estudo “Global Food & Drink Trends 2018” realizado pela Mintel (2017), é possível perceber que algumas das principais tendências de mercado são a confiança e transparência, o autocuidado, os produtos à base de plantas, as novas experiências sensoriais, a conveniência e praticidade, e a sustentabilidade [36]. Segundo esse estudo, os consumidores exigem transparência total e completa por parte das empresas de alimentos e bebidas, o que por sua vez já levou a um aumento no uso de alegações éticas, ambientais e de produto natural. Por exemplo, entre setembro de 2016 e agosto de 2017, o lançamento de alimentos e bebidas com alegações de produto natural aumentou em 17 %, e o lançamento de alimentos e bebidas com alegações éticas e ambientais aumentou em 22 %. No geral, a transparência exigida tem o propósito de ajudar os consumidores a sentirem-se mais confiantes acerca da segurança e da pureza dos produtos que consomem, mas essa transparência assume várias formas e alguns indivíduos estão interessados simplesmente em saber onde é que o produto foi produzido ou fabricado. Quanto ao autocuidado, o que se verifica é que uma grande parte das pessoas que se sentem sobrecarregadas com o ritmo frenético da vida moderna estão a tentar concentrar-se em “cuidar de si” e em priorizar o tempo e esforços para se dedicarem a si próprias, como forma de escaparem da negatividade das suas vidas. As abordagens para o bem-estar pessoal variam de acordo com o indivíduo, mas são cada vez mais marcadas por consumidores que

desenvolvem as suas próprias definições de dietas e estilos de vida saudáveis. Este aspeto, aliado à maior conscientização sobre os problemas do sal, do açúcar e da gordura para a saúde, tem aumentado a aversão a esses ingredientes específicos. Os ingredientes à base de plantas também parecem atrair um número cada vez maior de consumidores, por um lado, para satisfazer os seus desejos, como demonstrado pelos 57 % dos consumidores de frutas dos Estados Unidos que afirmam comer fruta para satisfazer os seus desejos e, por outro lado, pela associação de muitas ervas, especiarias e vegetais com a sensação de relaxamento. Por exemplo a camomila, a erva-cidreira e a lavanda foram as principais plantas utilizadas nos alimentos e bebidas com propriedades relaxantes que foram lançados entre 2016 e 2017 [36]. Além disso, de acordo com um estudo realizado em conjunto pelo Centro Vegetariano e pela empresa AC Nielsen, de 2007 para 2017, a população portuguesa que seguia uma alimentação vegetariana quadruplicou, e a que seguia uma alimentação vegan duplicou, com 1,2 % da população (120 mil portugueses) a não consumir carne nem peixe (alimentação vegetariana) e 0,6 % da população (60 mil portugueses) a não consumir carne, peixe, ovos nem laticínios (alimentação vegan) no final desse período, o que sugere uma tendência crescente para dietas com base vegetal em Portugal [37]. Novamente de acordo com o estudo *Global Food & Drink Trends 2018*, os alimentos que proporcionam novas experiências sensoriais também são uma das grandes tendências. Já no *Global Food & Drink Trends 2016* se tinha observado o potencial dos alimentos e bebidas cativarem o consumidor por meio dos sentidos, nomeadamente através das formas, das fragrâncias e sobretudo das cores. Atualmente a cor continua a ser importante, mas a textura é a principal característica capaz de tornar os produtos mais cativantes para quem os consome. Os alimentos e bebidas capazes de despertar vários sentidos, podem proporcionar aos consumidores uma forma de “fugir” da rotina e do stress quotidiano, bem como novas oportunidades para criar memórias ou gerar publicações “dignas” das redes sociais. De facto, de acordo com a pesquisa da Mintel, cerca de 37 % dos espanhóis, 36 % dos polacos, 26 % dos franceses e 22 % dos alemães e italianos, estão abertos a experimentar produtos com texturas incomuns. Exemplos desse tipo de produtos pelos quais os consumidores mostram cada vez mais interesse incluem bebidas mastigáveis, refrigerantes com textura, híbridos entre biscoitos e batatas-fritas e sumos com incorporação de sementes ou grãos. De salientar ainda que os alimentos e bebidas, tanto com cores vibrantes como com texturas incomuns, parecem ter como alvo particular os consumidores mais jovens (com idades compreendidas entre os 10 e os 27 anos), pois esses cresceram com a tecnologia e isso tornou a interatividade e a documentação (principalmente através das redes sociais) indispensáveis na sua vida quotidiana. Relativamente à tecnologia, esta tem também a vantagem de ajudar a tornar as compras mais simples, práticas e convenientes. Por um lado, os consumidores, com

as suas vidas ocupadas e stressantes, sentem-se atraídos por sites de comércio eletrónicos, aplicações móveis, controlo de voz e outras aplicações on-line, principalmente motivados pelo potencial de economizar tempo e dinheiro. Por outro lado, as empresas e os retalhistas podem aproveitar a tecnologia para criar promoções e recomendações personalizadas, com base nas preferências e hábitos de compra de cada indivíduo em particular, para estabelecer combinações entre categorias de produtos e para criar soluções engenhosas que economizem o tempo e o esforço dos consumidores. Também à custa da tecnologia, empresas voltadas para o futuro estão a trabalhar em soluções para substituir os tradicionais alimentos (criados em quintas e fábricas) por ingredientes e produtos acabados cientificamente projetados, como por exemplo carne produzida em laboratório e laticínios de origem não animal. Estes alimentos e bebidas cientificamente projetados são muito atrativos para toda a população vegan e vegetariana, mas também para todos os consumidores que se preocupam em reduzir as emissões de gases com efeito de estufa e em preservar o meio ambiente. Na mesma linha de pensamento, cada vez mais consumidores se preocupam em adquirir produtos que sejam ecologicamente corretos, sustentáveis e amigos do ambiente, como produtos cuja produção implique um menor gasto de água ou cuja embalagem não seja de plástico, ainda que esses sejam mais caros comparativamente com os seus equivalentes menos sustentáveis e ecológicos. Por exemplo, um em cada cinco brasileiros que fazem compras em supermercados concordam que os produtos ecologicamente corretos, como aqueles que possuem embalagens recicláveis, valem um custo extra [36].

Além das principais tendências de mercado identificadas pela Mintel (2017), segundo a Eurofood (2001), e conforme citado por Bogue (2006), no futuro “ as três refeições tradicionais por dia passarão a ser cinco feitas à pressa, pois os consumidores planeiam as suas refeições em torno das suas vidas e não as suas vidas em torno das suas refeições” [38]. De acordo com Boyle e Emerton (2002), conforme citado por Bogue (2006), o estilo de vida mais ocupado dos indivíduos com idades compreendidas entre os 18 e os 35 anos, tem impulsionado a procura por produtos convenientes e enquadrados na categoria *on-the-go*, isto é, produtos especificamente projetados para consumir em movimento ou durante as deslocações, nomeadamente de casa para o trabalho e do trabalho para casa. Consequentemente, muitos retalhistas e fabricantes de alimentos têm procurado adaptar as suas ofertas de produtos a esta alteração de hábitos, nomeadamente através da criação de embalagens portáteis, da alteração da quantidade das porções ou da alteração da qualidade nutricional dos seus produtos *on-the-go* [38].

Apesar de todos estes hábitos e tendências bem evidenciados, a natureza cada vez mais competitiva do setor agroalimentar, aliada ao facto dos consumidores estarem cada vez mais

informados, conscientes e exigentes, faz crescer a importância de se integrar o consumidor no processo de desenvolvimento de novos produtos, particularmente durante as fases iniciais desse processo [38]. A título de exemplo, a pesquisa de Bogue (2006) explorou o conceito do desenvolvimento de novos produtos orientado para o mercado, através da utilização de informações da “voz do consumidor”. Os resultados dessa pesquisa permitem tirar algumas conclusões interessantes, tais como: (1) a maioria dos participantes mostraram não se importar com o facto do seu pequeno-almoço ser igual todos os dias, mas afirmaram tentar variar nos alimentos ingeridos ao almoço e ao jantar; (2) os participantes mais velhos pareceram menos propensos a “saltar” refeições, em comparação com os mais jovens que afirmaram fazê-lo com alguma frequência, principalmente o pequeno-almoço, devido à falta de apetite pela manhã ou à falta de tempo relacionada com a deslocação para o trabalho; (3) a maioria dos participantes estava ciente das implicações de “saltar” refeições, salientando consequências a curto prazo como perda de energia e de concentração, fraqueza, cansaço e mau-humor; (4) a maioria dos participantes mostrou-se conhecedora dos produtos *on-the-go*, mas muitos expressaram sentimentos negativos em relação aos mesmos, sobretudo os mais velhos, afirmando que uma dieta saudável e um estilo de vida agitado são mutuamente exclusivos; (5) quando questionados acerca das bebidas substitutas de refeições, a maioria dos indivíduos afirmou achar o conceito pouco atraente, associado a produtos processados, não naturais, menos saciantes e menos prazerosos em comparação com as refeições “mastigáveis”; e por último (6) quando questionados acerca das bebidas complementares de refeições, a maioria dos indivíduos já se mostrou recetiva ao conceito, considerando preferível obter os nutrientes a partir de alimentos ou bebidas do que a partir de suplementos dietéticos, e alguns até afirmaram que preferiam ingerir uma bebida à base de frutas que contivesse as vitaminas em falta no seu organismo do que tomar um comprimido suplementar [38]. Tendo em conta estes hábitos e comportamentos alimentares identificados por Bogue (2006) e que são potenciados, em grande parte, pela falta de tempo para a confeção, e por vezes até para o consumo, dos lanches e refeições, é possível concluir que os novos produtos alimentares mais práticos e convenientes, enquadrados nos conceitos *ready-to-eat* (já prontos para consumo) e *on-the-go*, representam uma grande oportunidade de mercado para as empresas alimentares europeias. Além disso, os produtos para consumo rápido na hora dos lanches ou em substituição do pequeno-almoço possuem maior probabilidade de sucesso que aqueles para consumo rápido em substituição do almoço ou do jantar.

Bogue (2006) afirma ainda que a procura por alimentos ou bebidas que contribuam para o bem-estar, bem como para uma alimentação e um estilo de vida saudáveis, representa uma verdadeira oportunidade de mercado para as empresas alimentares europeias [38]. Associado a

isto, vários autores mostram que a preocupação em adotar uma dieta e um estilo-de-vida saudáveis está frequentemente interligada com a prática desportiva, como forma de os indivíduos se tornarem fisicamente ativos e de melhorarem a sua saúde [39]. De acordo com Lera-López e Rapún-Gárate (2011), conforme citado por Oliveira-Brochado (2017), outras razões que podem levar a essa prática incluem motivos recreacionais, o desejo de manter-se magro ou em forma, e ainda a competição e o desenvolvimento profissionais. Anokye *et al.* (2012), conforme citado por Oliveira-Brochado (2017), acrescentam que muitas pessoas tendem a praticar desporto por sentirem que isso pode ajudá-las a aliviar o stress e a esquecer as preocupações do dia-a-dia e/ou ajudá-las a tornarem-se mais atraentes [39]. Segundo a PORDATA, desde 2006 que o número médio anual de desportistas federados em Portugal tem aumentado, tendo atingido os 60,6 por cada mil habitantes no ano de 2017, o que corresponde a um total de 606 mil desportistas federados residentes em Portugal [40]. Desta forma, os produtos específicos para quem pratica desporto também parecem constituir uma boa oportunidade de mercado para as empresas do setor alimentar.

A última grande tendência que não pode passar despercebida é a cerveja sem álcool. Atualmente esse tipo de bebida constitui um segmento do mercado da cerveja em rápido crescimento, não só nos países da UE, mas em todo o mundo [41].

Assim, após a perceção de todas estas aspetos relativos ao mercado alimentar em Portugal, optou-se por fazer uma investigação mais profunda acerca das bebidas para desportistas, bem como das cervejas sem álcool.

3.1.1. Bebidas de reposição hidroeletrólítica

Ao investigar mais acerca desse tipo de produtos, percebeu-se que atualmente estão disponíveis no mercado duas grandes categorias de bebidas: as bebidas de reposição hidroeletrólítica (*sport drinks*) e as bebidas de reposição energética (*energy drinks*).

As bebidas energéticas geralmente contêm substâncias estimulantes não nutritivas, isto é, com supostos efeitos ergogénicos (como a cafeína, taurina, L-carnitina, creatina, glucuronolactona, guaraná e/ou ginseng), e também podem conter quantidades variáveis de carboidratos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais; são publicitadas como tendo capacidade para reduzir o cansaço e aumentar a performance física e mental, a resistência, a energia e a concentração [42, 43]. Apesar das bebidas energéticas serem frequentemente associadas ao desporto, muitos estudos científicos demonstram que essas bebidas, além de não fornecerem os nutrientes de que os desportistas necessitam, apresentam diversos efeitos prejudiciais para a saúde dos seus consumidores, não sendo por isso recomendadas para

crianças nem adolescentes [42, 43]. Desta forma, esta tipologia de bebidas parece pouco promissora, dada a preocupação crescente para com a saúde e o bem-estar.

Já as bebidas hidroeletrólíticas, que por sua vez podem ser subdivididas em hipotónicas, isotónicas e hipertónicas, conforme a sua osmolaridade, geralmente contêm carboidratos, minerais (por exemplo, sódio, potássio, cálcio e magnésio) e também podem conter aromatizantes, vitaminas ou outros nutrientes, possuindo três grandes funções [42]. Uma dessas funções consiste em permitir a reposição das reservas de carboidratos uma vez que, à medida que o exercício decorre e/ou que a sua intensidade aumenta, uma porção cada vez maior da energia que é necessária para os músculos passa a ser proveniente dos carboidratos, e as reservas desses nutrientes no nosso organismo (na forma de glucose plasmática e de glicogénio hepático e muscular) são bastante limitadas. Como tal, se ao longo do exercício essas reservas não forem sendo repostas, isso resultará num desenvolvimento mais rápido da fadiga e, conseqüentemente, numa menor *performance* física, numa recuperação pós-exercício mais difícil e ainda num enfraquecimento do sistema imunitário [44]. Assim, a ingestão de bebidas hidroeletrólíticas, tanto nos momentos que antecedem o exercício físico como ao longo do mesmo, irá evitar a depleção das reservas de carboidratos que são necessárias para os músculos e, por conseguinte, todos esses efeitos indesejáveis para a saúde e rendimento atlético dos desportistas. Para que o fornecimento de energia aos músculos seja rápido, a taxa de oxidação dos carboidratos presentes na bebida deve ser elevada, e para tal é importante que tanto a velocidade de esvaziamento gástrico como a taxa de absorção do intestino delgado para a circulação sanguínea, sejam elevadas [45].

No que diz respeito à velocidade de esvaziamento gástrico, uma vez que esta é tanto maior quanto maior for o volume contido no interior do estomago, será mais vantajoso para o desportista ingerir volumes maiores da bebida, ainda que em intervalos de tempo mais longos (por exemplo 200-250 mL a cada 20-30 minutos), do que ingerir volumes menores em intervalos de tempo mais curtos (por exemplo 50-100 mL a cada 10-15 minutos) [46]. Além disso, soluções contendo um teor de carboidratos de 6-8 % (p/v) parecem ser as mais eficazes a promover um rápido esvaziamento gástrico sem causar problemas gastrointestinais [47]. Por último, as bebidas que possuem uma osmolaridade mais próxima da do plasma (280-300 mOsmol/kg), denominadas de isotónicas, também permitem um esvaziamento gástrico mais acelerado (sobretudo se ingeridas a uma temperatura inferior à ambiente) [48] em comparação com aquelas que possuem uma osmolaridade inferior ou superior à do plasma, denominadas de hipotónicas (50-280 mOsmol/kg) ou hipertónicas (>300 mOsmol/kg), respetivamente. Contudo, tanto as bebidas hipotónicas como as hipertónicas ainda podem ser consideradas repositores hidroeletrólíticos adequados para desportistas, desde que ainda permitam um

esvaziamento gástrico acelerado e sejam de fácil absorção [46]. Uma vez que os monossacarídeos apresentam uma osmolaridade superior aos dissacarídeos e polissacarídeos, alguns estudos indicam que os repositores hidroeletrólíticos não devem conter mais que 5 % (p/v) de carboidratos na forma de glucose, mas podem conter dissacarídeos (como a sacarose) ou polissacarídeos (como as maltodextrinas) em concentrações de 6-8 % (p/v) [48]. De notar que, além da velocidade de esvaziamento gástrico influenciar a taxa de absorção dos carboidratos que fornecerão energia para os músculos, ela também determina a capacidade de reidratação da bebida ingerida, pois quanto mais rapidamente o líquido ingerido sair do estômago, mais rapidamente ele chegará ao intestino delgado e maior será a capacidade de reidratação dessa bebida [45].

No que diz respeito à taxa de absorção do intestino delgado para a circulação, esta é maior em bebidas contendo misturas de diferentes carboidratos que são transportados através da membrana intestinal por diferentes proteínas transportadoras, do que em bebidas contendo carboidratos que utilizam o mesmo tipo de transportador, pois quanto maior for a diversidade de transportadores necessários para a mesma quantidade de moléculas a transportar, menor será a competição por cada um deles. A título de exemplo, de acordo com o estudo efetuado por Jentjens *et al.* (2003), e conforme citado por Jeukendrup (2004), comparativamente com a ingestão de uma bebida contendo apenas glucose, a ingestão de bebidas contendo misturas isoenergéticas de glucose/frutose ou de glucose/sacarose resulta em taxas de oxidação de carboidratos bastante superiores, mas a ingestão de bebidas contendo misturas isoenergéticas de glucose/maltose já não [45], uma vez que a hidrólise da maltose dá origem a mais dois resíduos de glucose.

Outra função dos repositores hidroeletrólíticos é prevenir a desidratação que, se acontecer, irá prejudicar o sistema circulatório e a termorregulação, diminuindo a *performance* atlética. Para perceber melhor como isso acontece, sabe-se que o calor gerado no decorrer do exercício leva o indivíduo a transpirar, o que por sua vez leva à perda de fluido extracelular e, conseqüentemente, o interior das células torna-se hipotónico relativamente a esse fluido, o que faz com que a água se movimente para o exterior das células. Posteriormente, para manter o equilíbrio osmótico no meio intracelular, a água desloca-se dos capilares sanguíneos para o interior das células, o que reduz o volume plasmático e aumenta a concentração de solutos (eletrólitos) no plasma sanguíneo. Por um lado, o aumento da concentração de solutos no sangue pode provocar arritmias cardíacas, colapso cardíaco e até mesmo morte. Por outro lado, a diminuição do volume plasmático traduz-se numa redução do fluxo sanguíneo para os músculos, redução do fornecimento de oxigénio às células musculares, redução da distribuição de água e eletrólitos e aumento da depleção do glicogénio muscular e hepático. De modo a

evitar todas essas consequências negativas, a transpiração é interrompida, mas essa interrupção faz com que a temperatura corporal aumente (sobreaquecimento), podendo culminar num choque térmico [49]. Assim, facilmente se percebe que os efeitos negativos da desidratação apenas podem ser atenuados, ou mesmo prevenidos, se ao longo do exercício o desportista conseguir que a ingestão de líquidos iguale a sua taxa de perda [50], o que não é completamente eficaz com a ingestão de água simples, uma vez que a sensação de sede está atrasada relativamente ao estado de desidratação [51] e a falta de sabor da água simples faz com que os indivíduos só a ingiram quando sentem sede, repondo apenas 1/2 a 2/3 do volume necessário [50]. Além disso, os desportistas que necessitam de uma rápida reidratação devem ingerir bebidas que promovam um rápido esvaziamento gástrico, para também serem rapidamente absorvidas ao nível do intestino delgado, o que é menos eficaz com a ingestão de água simples do que com a ingestão de bebidas de maior osmolaridade [52].

A terceira grande função das bebidas hidroeletrólíticas consiste em permitir a reposição dos eletrólitos que também são perdidos através da transpiração. De acordo com o estudo de Brouns *et al.* (1992), conforme citado por Brouns e Kovacs (1997), as perdas de sódio e cloreto através do suor são superiores às de potássio, cálcio e magnésio, sendo estes os principais eletrólitos perdidos durante o exercício físico (Tabela 7) [46]. Na Tabela 8 encontram-se as funções mais importantes desempenhadas por alguns dos principais eletrólitos perdidos no suor.

Tabela 7: Teor de sódio, cloreto, potássio, cálcio e magnésio no suor, e teor máximo recomendado dos mesmos eletrólitos, em bebidas destinadas a consumir durante o exercício físico. Adaptado a partir de [46].

Mineral	Teor no suor (mg/L)	Teor máximo recomendado em bebidas (mg/L)
Sódio	413 - 1091	1100
Cloreto	533 - 1495	1500
Potássio	121 - 225	225
Cálcio	13 - 67	225
Magnésio	4 - 34	100

Tendo em conta a perda de eletrólitos associada à transpiração, Takamata *et al.* (1994), conforme citado por Aoi *et al.* (2006), sugerem que, durante um exercício prolongado, a reidratação promovida apenas pela ingestão de grandes quantidades de água pode causar hiponatremia, que se caracteriza por concentrações anormalmente baixas de sódio no sangue, e

inibir a libertação da hormona antidiurética (ADH), o que por sua vez diminui a vontade de ingerir água e aumenta a produção de urina, resultando em desidratação espontânea [53]. Assim, as bebidas ingeridas com o objetivo evitar a desidratação, além de água e carboidratos, também devem conter eletrólitos, nomeadamente sódio. Conforme citado por Brouns e Kovacs (1997), Gisolfi *et al.* (1992) verificaram que após a ingestão de uma solução isotónica composta por água, cloreto de sódio e carboidratos, a taxa de absorção de água num segmento do intestino delgado foi cerca de cinco vezes superior à verificada após a ingestão de uma solução isotónica composta apenas por água e cloreto de sódio, o que poderá ser explicado pelo facto de os carboidratos e o sódio, possivelmente, partilharem o mesmo sistema de transporte ativo acoplado através da parede intestinal [46].

Tabela 8: Resumo das funções mais importantes desempenhadas por alguns dos principais eletrólitos perdidos através do suor. Adaptado a partir de [51].

	Funções mais importantes
Sódio	Ajuda a regular o equilíbrio de fluidos, o equilíbrio ácido-base e a transmissão nervosa. Diminuições excessivas deste eletrólito podem causar cólicas e hiponatremia nos atletas.
Potássio	Ajuda a regular o equilíbrio de fluidos, o equilíbrio ácido-base e a transmissão nervosa. Aumentos ou diminuições excessivas deste eletrólito podem causar cólicas nos atletas.
Cálcio	Está envolvido na formação de ossos e dentes, coagulação sanguínea e transmissão nervosa. Estimula o metabolismo lipídico.
Magnésio	Ativa enzimas envolvidas na síntese de proteínas. Pensa-se que possa melhorar o metabolismo energético/ a disponibilidade de ATP.
Ferro	É um componente da hemoglobina nos glóbulos vermelhos, permitindo o transporte de oxigénio na corrente sanguínea; ajuda a aumentar o desempenho aeróbico durante o desporto.
Zinco	É um constituinte das enzimas envolvidas na digestão; está associado à imunidade, podendo reduzir a incidência de infeções do trato respiratório superior em atletas envolvidos em treino pesado.

Assim, as bebidas desenvolvidas com o propósito de beneficiar a saúde e a *performance* física dos desportistas, além de água, devem conter 40-80 g/L (idealmente 60-80 g/L) de carboidratos e um teor de sódio superior a 400 mg/L (idealmente, superior a 600 mg/L) [46]. Algumas bebidas comerciais contendo carboidratos e minerais possuem níveis de potássio e magnésio que excedem em muito a quantidade dos mesmos que é perdida através do suor, mas contêm baixos teores de sódio. Exemplos disso são os sumos de fruta e as águas minerais, que geralmente apresentam um elevado teor de potássio e um elevado teor de cálcio e magnésio,

respetivamente, mas ambas possuem reduzido teor de sódio, pelo que são desadequadas para desportistas. Bebidas com níveis de sódio bastante inferiores aos níveis de outros eletrólitos podem até causar secreção líquida de água em vez de absorção, tornando-se assim incapazes de promover uma rápida reidratação [46].

3.1.2. Cervejas sem álcool

Embora, durante muito tempo as vendas de cerveja sem álcool não tenham atendido às expectativas iniciais otimistas e o mercado com esses produtos tenha sido apenas uma gota no mar da produção total de cerveja, atualmente as cervejas sem álcool constituem um segmento do mercado da cerveja em rápido crescimento em todo o mundo. Só entre 2007 e 2012, as vendas médias na Europa aumentaram em 50 %. Provavelmente, as razões mais significativas para o aumento anual das vendas dessa bebida sem álcool nos países da União Europeia (UE), são os requisitos legais mais rigorosos quanto ao consumo de álcool durante o trabalho e por quem conduz (associado à possibilidade de perda da carta de condução), bem como a crescente conscientização dos consumidores acerca da importância de um estilo-de-vida saudável, e para o qual contribui um consumo responsável de bebidas alcoólicas [41]. De facto, o abuso de álcool tem estado na agenda pública por muitos anos, uma vez que aumenta o risco de crimes violentos, acidentes de trânsito, desordem pública e danos à saúde humana. Quando o etanol é ingerido através da cerveja, ao chegar aos tecidos ele é metabolizado em acetaldeído, principalmente no estômago e no fígado, e o acetaldeído é altamente tóxico, ligando-se a constituintes celulares e gerando adutos que são prejudiciais [41].

Simultaneamente, há fortes evidências de que o consumo moderado de cerveja não só tem um melhor resultado para a saúde a longo prazo, comparativamente com o seu consumo excessivo, como é ainda melhor que a abstenção. O consumo moderado de cerveja mostrou ser, pelo menos, tão eficaz quanto o consumo de vinho, reduzindo o risco de doenças coronárias, ataque cardíaco, diabetes e mortalidade geral. Esses efeitos positivos podem ser atribuídos a toda uma gama de propriedades e substâncias valiosas relacionadas com os cereais e com o lúpulo que são utilizados no fabrico da cerveja, mas também com a ausência de gordura ou colesterol, com o baixo teor energético e de açúcar livre, e com o elevado teor de antioxidantes (como os polifenóis e os flavonoides), magnésio e fibra solúvel. Além disso, a cerveja fornece vitaminas e minerais essenciais, contribuindo assim para uma dieta equilibrada e saudável. As cervejas sem álcool reivindicam os mesmos efeitos benéficos dos componentes saudáveis das cervejas mais comuns, com um efeito simultâneo da menor ingestão de energia e da completa ausência dos impactos negativos do consumo excessivo de álcool [41].

As cervejas sem álcool também representam uma alternativa interessante para pessoas que se encontram sob medicação, bem como para as mulheres que estão grávidas ou a amamentar os filhos, uma vez que já se comprovou que essas bebidas estimulam a produção de leite materno, e ainda para todas as pessoas que não podem consumir álcool por motivos religiosos [7, 54]. Além disso, pode ser possível comprovar as propriedades isotônicas das cervejas sem álcool, o que por sua vez pode levar à produção de bebidas alternativas com interesse para atletas [7]. Como as razões para o consumo de cerveja sem álcool diferem, as leis nacionais também diferem. Na maioria dos países da UE, as cervejas com baixo teor alcoólico são divididas em cervejas sem álcool, contendo um volume alcoólico não superior a 0,5 %, e em cervejas de baixo teor alcoólico, contendo um volume alcoólico não superior a 1,2 %. Nos Estados Unidos, uma cerveja só é denominada sem álcool se o seu teor alcoólico for nulo, enquanto a cerveja denominada não alcoólica possui um máximo de 0,5 % de álcool por volume. Nos países que aplicam a proibição religiosa, o teor alcoólico das bebidas não deve exceder os 0,05 % em volume [41, 54].

As principais abordagens para a produção de cervejas sem álcool podem ser classificadas em dois grandes grupos, sendo eles os métodos físicos e os métodos biológicos. A principal diferença entre ambos é que, no primeiro caso, o álcool é removido da cerveja final que foi fermentada normalmente, o que exige investimentos consideráveis no equipamento próprio para esse fim, mas permite remover o álcool para níveis extremamente baixos. No último caso, durante a fermentação a produção de álcool é inibida para se manter dentro de certos limites, o que não exige investimentos consideráveis em equipamentos específicos, mas geralmente origina produtos com *off-flavours* a mosto e que dificilmente possuem um teor alcoólico próximo de 0 % [41].

Diferentes técnicas resultarão em produtos finais com características um pouco diferentes entre si. Em qualquer dos casos, espera-se que os produtos finais obtidos sejam bastante diferentes dos seus equivalentes alcoólicos, nomeadamente em termos de aroma e sabor, uma vez que o álcool por si só tem grande influência nessas propriedades. O etanol aumenta a retenção de aldeídos e ajuda a perceber o sabor de outros componentes da cerveja, reduzindo a percepção do sabor a mosto. Portanto, cervejas sem álcool produzidas com as tecnologias que hoje são conhecidas e aplicadas, atingirão apenas uma qualidade sensorial próxima da das cervejas comuns, podendo sofrer de várias imperfeições quando comparadas com as últimas, como menos corpo, um baixo perfil aromático, um sabor mais doce e *off-flavours* a mosto [7, 54].

3.2. Geração de ideias

No momento de gerar ideias para o novo produto, começou-se por elaborar um esquema (Figura 22) com a informação mais importante a reter do estudo de mercado efetuado anteriormente.

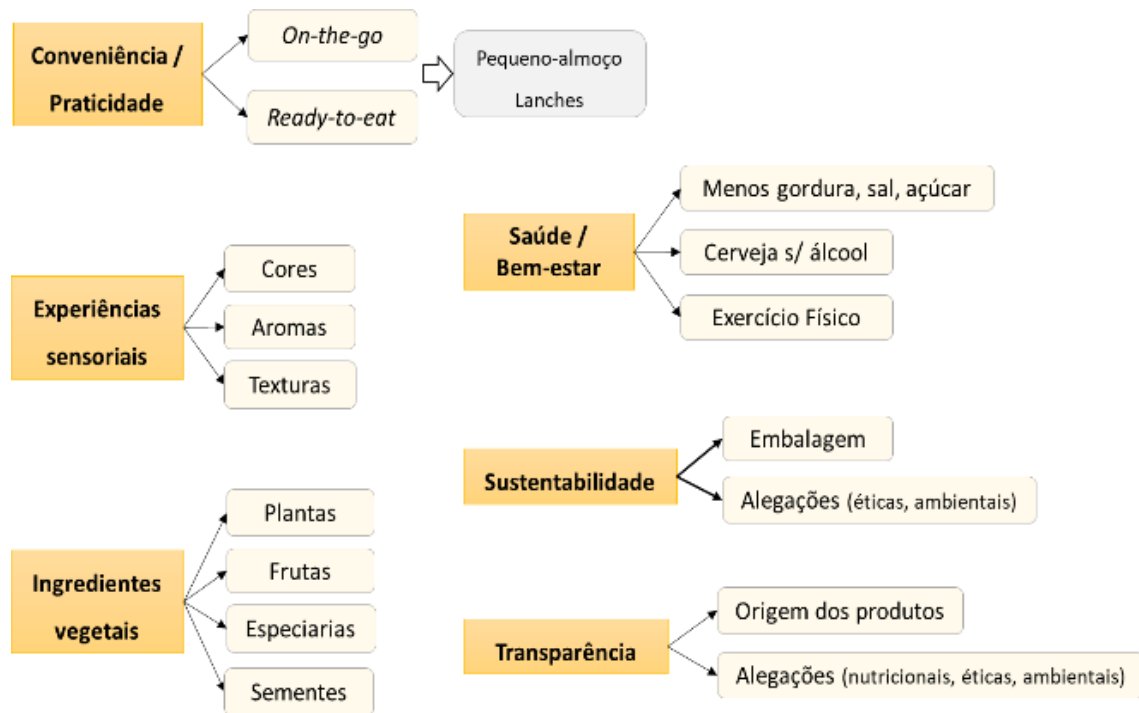


Figura 22: Principais tendências de mercado identificadas a partir da análise do setor alimentar em Portugal, no desenvolvimento estruturado do produto.

A partir da análise desse esquema, a primeira ideia que surgiu foi a de uma bebida de reposição hidroeletrólítica, capaz de conferir benefícios físicos e nutricionais a todos os praticantes de desporto. Outra ideia que surgiu foi a de uma bebida *on-the-go*, à base de cereais, com incorporação de fruta e/ou com sabor a chocolate, baunilha ou café, que pudesse substituir um pequeno-almoço ou um lanche mastigável. Uma espécie de refrigerante com cereais e fruta, mas mais saudável que os refrigerantes tradicionais, foi outra das ideias que surgiram. Por fim, veio à mente a possibilidade de se desenvolver uma cerveja sem álcool, com todo o sabor de uma cerveja tradicional, mas isenta de álcool, para quem por algum motivo não quer ou não pode ingerir bebidas alcoólicas.

Inicialmente, todas estas ideias pareceram adequadas para desenvolver um novo produto com potencial de sucesso no mercado, por vários motivos: em primeiro lugar pela sua conveniência e praticidade, uma vez que todas dizem respeito a bebidas prontas para consumo

(*ready-to-eat*) e, dependendo da sua embalagem, aptas a consumir em movimento (*on-the-go*); em segundo lugar por irem ao encontro da preocupação crescente com a saúde e o bem-estar; também por fazerem uso de ingredientes de origem vegetal, como é o caso dos cereais e da fruta; e ainda por poderem proporcionar novas experiências sensoriais através das cores e aromas naturais dos ingredientes de origem vegetal. Mais ainda, à partida, todas poderiam ser produzidas à base de malte.

3.3. Seleção da ideia mais promissora

De forma a seleccionar a ideia mais promissora, de entre as quatro geradas anteriormente, para cada uma tentou-se identificar o seu público-alvo, o local e o momento do seu consumo, e ainda os principais produtos concorrentes já presentes no mercado.

Quanto ao público-alvo, percebeu-se que a bebida de reposição hidroelectrolítica seria destinada apenas a desportistas, uma vez que as pessoas fisicamente inativas não sentem qualquer necessidade de consumir um produto desse tipo e, de acordo com os resultados do estudo conduzido por Oliveira-Brochado (2017), os indivíduos que praticam desporto são maioritariamente jovens do sexo masculino, não casados, sem filhos de idade inferior a dois anos, com uma boa percepção da sua saúde e que não fumam mas bebem regularmente [39]. Já a bebida à base de malte e/ou cereais não maltados seria mais atractiva para pessoas jovens, que estudam ou trabalham, e que possuem vidas muito agitadas com pouco tempo disponível para a confeção dos seus lanches e refeições, não sendo necessariamente pessoas com um estilo-de-vida saudável ou preocupadas em seguir um estilo-de-vida saudável. Uma vez que alguns indivíduos, sobretudo os de mais idade, tendem a ver este tipo de produtos como menos naturais, menos saciantes e menos prazerosos em comparação com os pequenos-almoços ou lanches mastigáveis, seria necessário um esforço acrescido para passar a informação contrária e convencer o consumidor a experimentar. Por sua vez, o refrigerante teria como principal público-alvo todos os adolescentes e adultos que apreciam os refrigerantes usuais, mas que muitas vezes optam por comprar outras bebidas (como sumos, águas com sabores e até mesmo os refrigerantes nas versões *diet* ou *light*) pelo facto de essas últimas transmitirem a ideia de serem mais saudáveis, conferindo assim um menor sentimento de culpa em comparação com os refrigerantes tradicionais. Pessoas que procuram bebidas gaseificadas, mas com um sabor diferente, também poderiam ser tentadas a experimentar este novo “refrigerante”. Por último, a cerveja sem álcool destinar-se-ia essencialmente a adultos que apreciam cerveja mas que tentam evitar a ingestão de álcool, ou que não podem de todo ingerir álcool (seja por motivos profissionais, religiosos, de saúde, ou outros), como é o caso dos condutores (taxistas, camionistas, etc), das pessoas que se encontram sob medicação, das pessoas cuja religião não

permite a ingestão de bebidas alcoólicas, das mulheres grávidas ou que estão a amamentar e dos desportistas.

De seguida, ao analisar cada uma das ideias quanto ao local e momento do seu consumo, percebeu-se que a bebida hidroelectrolítica poderia ser ingerida durante a prática desportiva, bem como nos momentos que a antecedem ou precedem e, como tal, em ginásios, piscinas, campos de futebol e outros locais destinados a essa prática. Já a bebida substituta de pequeno-almoço ou lanche destinar-se-ia a ser ingerida em casa, no emprego/escola ou durante a deslocação entre esses dois locais e, portanto, antes do trabalho/aulas começarem ou depois de acabarem. Quanto ao refrigerante e à cerveja sem álcool, estes dois tipos de bebidas deveriam ser ingeridos essencialmente à hora do almoço ou do jantar, neste caso num restaurante, em casa ou no emprego, mas também poderiam ser bebidas escolhidas para acompanhar uma conversa com amigos num café ou num bar, por exemplo.

Por último, compreendeu-se que a bebida de reposição hidroelectrolítica teria como principais produtos concorrentes outras bebidas já prontas para consumo e com a mesma função que essa, isto é, fornecer a energia necessária para os músculos, fornecer os minerais perdidos através do suor e hidratar o organismo, como é o caso de alguns produtos das marcas Gatorade, Powerade, Aquarius e Isostar. Já os principais concorrentes da bebida de malte e/ou cereais não maltados seriam outras bebidas também à base de cereais, já prontas para consumo e que pudessem substituir as mesmas refeições, como por exemplo a bebida Nesfit de aveia e cacau da Nestlé, a Super Malte da Refriango e alguns produtos da Ovomaltine. No que diz respeito ao refrigerante saudável, por este se enquadrar tanto na categoria dos refrigerantes como na categoria das bebidas com sabores que não são refrigerantes, ele iria encontrar uma grande diversidade de produtos concorrentes, nomeadamente refrigerantes como Fanta, 7Up, Coca-cola, Pepsi e Sumol (nas versões *diet*, *light* e tradicional), sumos como o Iced tea e o Compal, águas com sabores como as das marcas Luso, Vitalis, Frize e Pedras, entre outros. Por último, a cerveja sem álcool iria competir com outras cervejas sem álcool, como as das marcas SuperBook, Heineken, Sagres, Erdinger, Itaipava e Estrella Galicia, com a vantagem de que seria das primeiras cervejas sem álcool fabricadas de forma artesanal em Portugal. Contudo, fabricar uma cerveja sem álcool que consiga reter todo o sabor de uma cerveja com álcool, como o consumidor está à espera, é um processo muito difícil, que exige um controlo muito rigoroso e/ou equipamento que é demasiado dispendioso para uma microcervejeira.

Após esta análise, o refrigerante saudável pareceu ser a ideia menos auspiciosa, enquanto a bebida hidroelectrolítica foi considerada a mais promissora no mercado atual e, portanto, foi a ideia selecionada para o desenvolvimento de um novo produto alimentar.

3.4. Definição do conceito

Para melhor se definir o conceito do novo produto, tentou-se responder às questões *O quê?*, *Para quem?*, *Quando e Onde?* e *Como?*.

O quê? Resposta: A ideia selecionada como sendo a mais promissora para o desenvolvimento de um novo produto alimentar, consiste numa bebida de reposição hidroeletrólítica que, por fornecer a energia do que os músculos necessitam, bem como a água e os minerais que são perdidos através do suor, é capaz de conferir vantagens tanto para a saúde como para o rendimento atlético de quem pratica desporto. No fundo, trata-se de uma bebida líquida já pronta para consumo (*ready-to-eat*), saudável, biológica, 100 % vegetal, de sabor refrescante, e que deverá ser ingerida a uma temperatura inferior à ambiente (4-6 °C) para causar uma maior sensação de frescura, auxiliar na regulação da temperatura corporal e aumentar a velocidade de esvaziamento gástrico, o que por sua vez se traduzirá numa maior capacidade de hidratação. Além disso, a incorporação de sumo de fruta tornará esta bebida sensorialmente mais agradável para o consumidor, conduzindo assim a uma maior ingestão voluntária da mesma, o que também se traduzirá numa maior capacidade de hidratação. Quanto às suas especificações nutricionais, para ser adequada para desportistas, a bebida hidroeletrólítica possuirá 60-80 g/L de carboidratos e um teor de sódio de 600-1100 mg/L. Assim, este novo produto enquadra-se na categoria 14.1.4.2 do *Codex Alimentarius*, intitulada de “Bebidas aromatizadas à base de água, não carbonatadas” onde se incluem as bebidas para desportistas contendo eletrólitos e também as bebidas energéticas não carbonatadas, entre outras [55].

Para quem? Resposta: A bebida será desenvolvida com o intuito de conferir benefícios físicos e nutricionais a todos os desportistas que, segundo o estudo conduzido por Oliveira-Brochado (2017), são pessoas mais jovens, do sexo masculino, não casadas, sem filhos com idade inferior a dois anos, com boa perceção da sua saúde, e que não fumam mas bebem regularmente [39]. De forma mais detalhada, a bebida será especialmente dirigida a adolescentes e jovens adultos, pois os dados estatísticos da base de dados PORDATA indicam que a maior parte dos desportistas federados tem até 18 anos (juniores) ou entre 20 e 35 anos (seniores) [56], e poderá ser consumida por ambos os géneros, apesar de se perspetivar uma maior aceitação por parte do público masculino que geralmente se mostra mais atraído pelas características *on-the-go* e *ready-to-eat* e também mais propenso a participar em desporto, com uma incidência 2,5 vezes superior ao público feminino [39, 57]. Segundo a PORDATA, em 2017 existiam 606 mil desportistas federados residentes em Portugal [40]. Além disso, como o produto não possuirá qualquer ingrediente de origem animal, ele também estará apto a ser

consumido por vegans e vegetarianos que, em Portugal, são cerca de 60 mil e 120 mil, respetivamente [37].

Quando e Onde? Resposta: A bebida será fabricada e comercializada durante todo o ano, e poderá ser encontrada em ginásios, piscinas, campos de futebol e outros espaços dedicados ao desporto, mas também em hipermercados, lojas de produtos alternativos/saudáveis, postos de abastecimento de combustível, máquinas de *vending*, e até mesmo no *brewpub* da empresa.

Como? Resposta: Uma vez que um mosto cervejeiro típico contém os principais nutrientes, isto é, os carboidratos e os minerais, de que os desportistas necessitam (rever ponto 3.5. *Ebulição*, do Capítulo I), a matéria-prima de partida para o desenvolvimento da nova bebida será o mosto utilizado para o fabrico de uma das cervejas Vadia. Contudo, uma vez que os carboidratos e o sódio deverão estar presentes no mosto original em teores ainda um pouco acima e um pouco abaixo, respetivamente, do desejado para um repositivo hidroeletrólítico, aquando dos testes de formulação será necessário testar diferentes diluições do mosto, bem como a adição de diferentes quantidades de sódio ou de fontes desse mineral. A inclusão de polpa ou sumo de fruta, além de poder conferir ao produto final alguns dos benefícios nutricionais dessa fruta, também poderá ajudar a tornar a cor, o aroma e o sabor dessa bebida mais apelativos para o consumidor, nomeadamente ao mascarar o sabor salgado conferido pelo sódio, pelo que será igualmente importante desenvolver protótipos para testar a inclusão de diferentes volumes de polpa ou de sumo de diferentes frutas. Além disso, para que a nova bebida possa conter o logótipo de produto biológico da UE, indo assim ao encontro de mais uma tendência de mercado que deverá ser valorizada pelo seu público-alvo, o mosto empregue no seu fabrico será o mesmo que é utilizado no fabrico da cerveja Vadia Orgânica (a qual possui certificação biológica), e pretende-se que todos os outros ingredientes utilizados também possuam certificação biológica. Assim, começar-se-á por produzir o mosto cervejeiro, exatamente da mesma forma que para o fabrico da Vadia Orgânica e, depois do respetivo mosto ser arrefecido através do permutador de placas, ser-lhe-á adicionado um volume da polpa ou do sumo de uma fruta. De seguida, a mistura obtida será diluída com água, até se atingir um teor de carboidratos de 60-80 g/L, e posteriormente adicionada de uma fonte de sódio para esse mineral esteja presente na bebida final numa concentração mínima de 400 mg/L. Eventualmente, poderão ainda adicionar-se outros ingredientes ou coadjuvantes tecnológicos (vitaminas, minerais, corantes, aromatizantes, conservantes ou outros), se isso se mostrar necessário. Por fim, a bebida será engarrafada e pasteurizada, utilizando os mesmos procedimentos e os mesmos equipamentos que para o engarrafamento e pasteurização dos restantes produtos da marca, mas com o cuidado de lhe atribuir o número de UP's mais adequado à sua composição. Assim, a tecnologia e os equipamentos necessários para fabricar

este produto serão os mesmos que se utilizam para fabricar os restantes produtos Vadia, mas a combinação exata dos vários ingredientes e a sua proporção relativa precisarão de ser afinadas através de testes de formulação, de tal forma que a bebida final seja sensorialmente agradável para o consumidor (em termos de aparência, aroma, sabor e textura), mas também possua o teor de carboidratos e minerais mais adequado para poder funcionar como uma bebida de reposição hidroeletrólítica, além de estabilidade físico-química e segurança microbiológica.

3.5. Questionário ao público-alvo

Uma vez dadas as respostas às questões *O quê?*, *Para quem?*, *Quando e Onde?* e *Como?*., procedeu-se à elaboração de um questionário (Anexo) para aplicar ao público-alvo do produto, com o intuito de se avaliar a sua aceitação e as suas expectativas quanto ao mesmo. O questionário foi dividido em três grandes partes: a primeira destinada a caracterizar a população inquirida, a segunda destinada a caracterizar os seus hábitos de consumo, e a terceira composta por questões acerca de características específicas do produto. Posteriormente, o respetivo questionário foi disponibilizado em associações e grupos relacionados com desporto, através das redes sociais, durante um período aproximado de três semanas. No final desse período, com um total de 384 inquiridos, analisaram-se todas as respostas obtidas na forma de gráficos.

Relativamente à primeira parte do questionário: 60 % dos inquiridos pertenciam ao género masculino e apenas 40 % eram do género feminino; a maioria apresentava idades compreendidas entre os 25 e os 39 anos (47 %) ou entre os 18 e os 24 anos (28 %); a grande maioria residia no distrito de Aveiro (47,9 %) (Figura 23) e era estudante (20,8 %) ou técnico ou profissional de nível intermédio (28,1 %); todos os indivíduos praticavam algum tipo de atividade física desportiva, e o que praticavam com maior frequência era a corrida (26,2 %), seguida da musculação (21,2 %) e esta do futebol/futsal (9,2 %) (Figura 24). No que diz respeito à segunda parte do questionário: a grande maioria dos inquiridos afirmou que raramente consumia produtos específicos para desportistas (33 %) e que nunca tinha ingerido nenhuma bebida à base de malte ou à base de mosto de cerveja, que não cerveja (84 %); por outro lado, aqueles que já tinham ingerido uma bebida desse tipo e tinham gostado (12 %) apontaram o sabor a cereais como o que mais valorizaram nesse produto (33 %), enquanto os que já tinham ingerido uma bebida desse tipo mas não tinham gostado (4 %) apontaram o sabor amargo como o aspeto que menos lhes agradou (17 %) (Figura 25). Quanto à última parte do questionário, a maioria dos indivíduos escolheu frutos silvestres e hortelã (20 %), maracujá (19 %) e morango (17 %) como sendo os

sabores que mais gostariam de experimentar numa bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja; quando questionados se comprariam ou não uma bebida desse tipo que lhes fosse apresentada como adequada para praticantes de desporto, apenas 35 % dos inquiridos responderam “sim” e 56 % responderam “talvez”; por fim, a maior parte dos indivíduos (73 %) apenas estaria disposta a pagar o preço mínimo sugerido por essa bebida, isto é, entre 1 a 2 € (Figura 26).

A partir dos resultados supramencionados concluiu-se que a ideia inicialmente selecionada como sendo a mais promissora não se apresentava, afinal, muito viável no mercado alimentar atual, pois a maioria dos inquiridos não estava totalmente disposta a comprar uma bebida semelhante e, daqueles que estavam, o preço que pagariam por ela seria, muito provavelmente, pouco rentável para a empresa. Percebeu-se então que tal poderia dever-se a uma caracterização errada do público-alvo da bebida pretendida; inicialmente definiu-se que o seu público-alvo seria qualquer pessoa que praticasse desporto, mas, ao analisar melhor as necessidades e hábitos alimentares desse grande conjunto de indivíduos, percebeu-se que isso poderia não estar totalmente correto. Os desportistas ocasionais, que não despendem muito tempo nem muito esforço físico para a prática de desporto, que não participam em competições nem necessitam do acompanhamento de nenhum profissional, praticando exercício físico apenas na sua própria casa ou na rua, nunca deverão chegar a sentir necessidade de ingerir um produto desse tipo, uma vez que a ingestão de água deverá ser suficiente para suprir as suas necessidades físicas e nutricionais. Já os desportistas de competição, que estão diariamente sujeitos a treinos de elevada intensidade e longa duração, que participam em competições e que necessitam de tempos de recuperação muito curtos, contando com o apoio de fisioterapeutas e de nutricionistas/dietistas especializados em nutrição para atletas, não podem introduzir na sua dieta alimentos que não sejam recomendados por esses profissionais e por isso também não deverão procurar um produto desse tipo. Assim, o verdadeiro público-alvo de uma bebida de reposição hidroeletrólítica, desenvolvida a partir de mosto de cerveja, seriam apenas os desportistas que se encontram entre as duas situações descritas, como aqueles que fazem parte de algum grupo de corrida ou que estão inscritos em clubes ou ginásios, mas que não competem, podendo ser eles próprios a escolher os produtos que consomem. Por este motivo, a ideia para o novo produto foi reformulada.

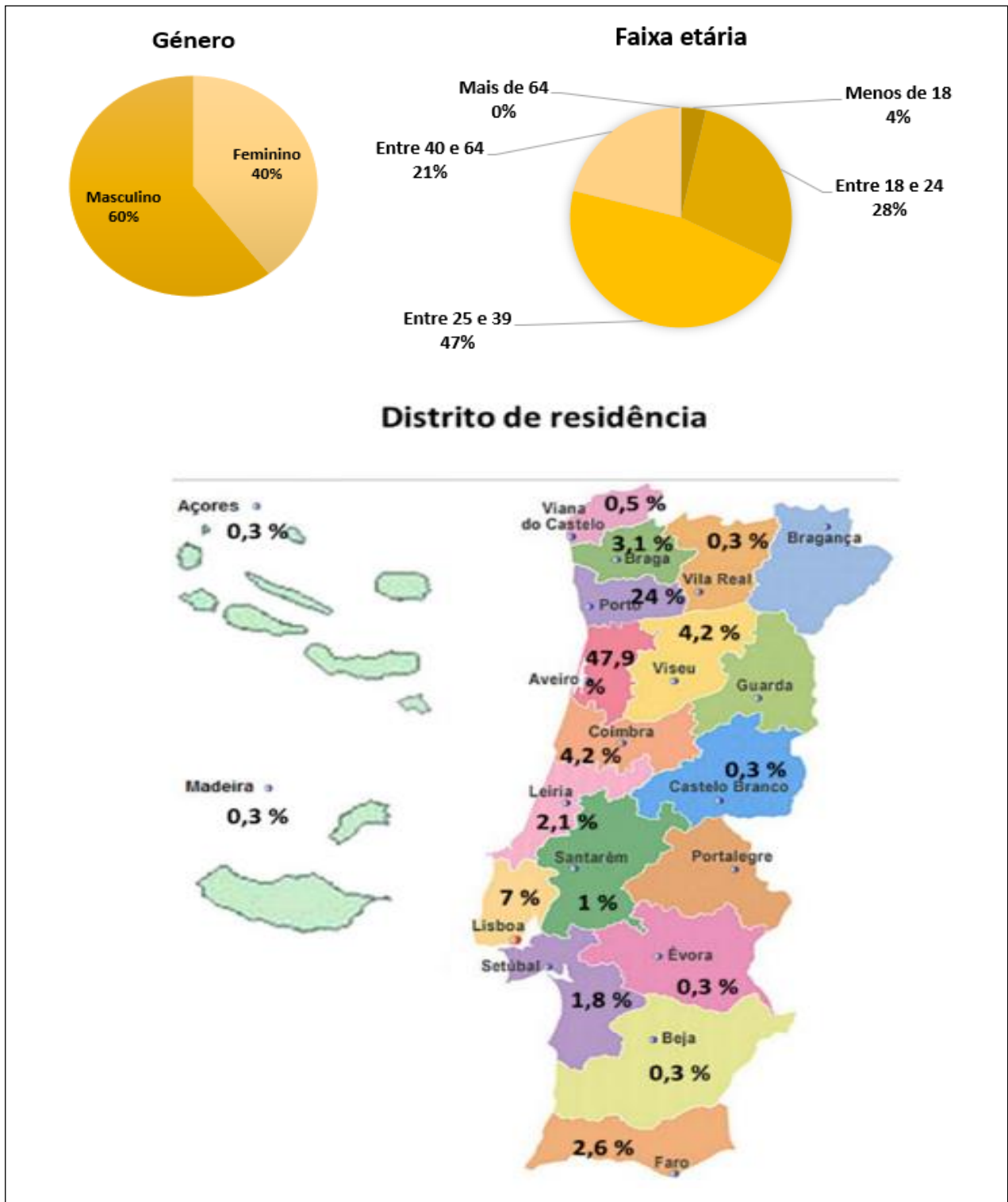


Figura 23: Análise gráfica das respostas às questões 1, 2 e 3, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.

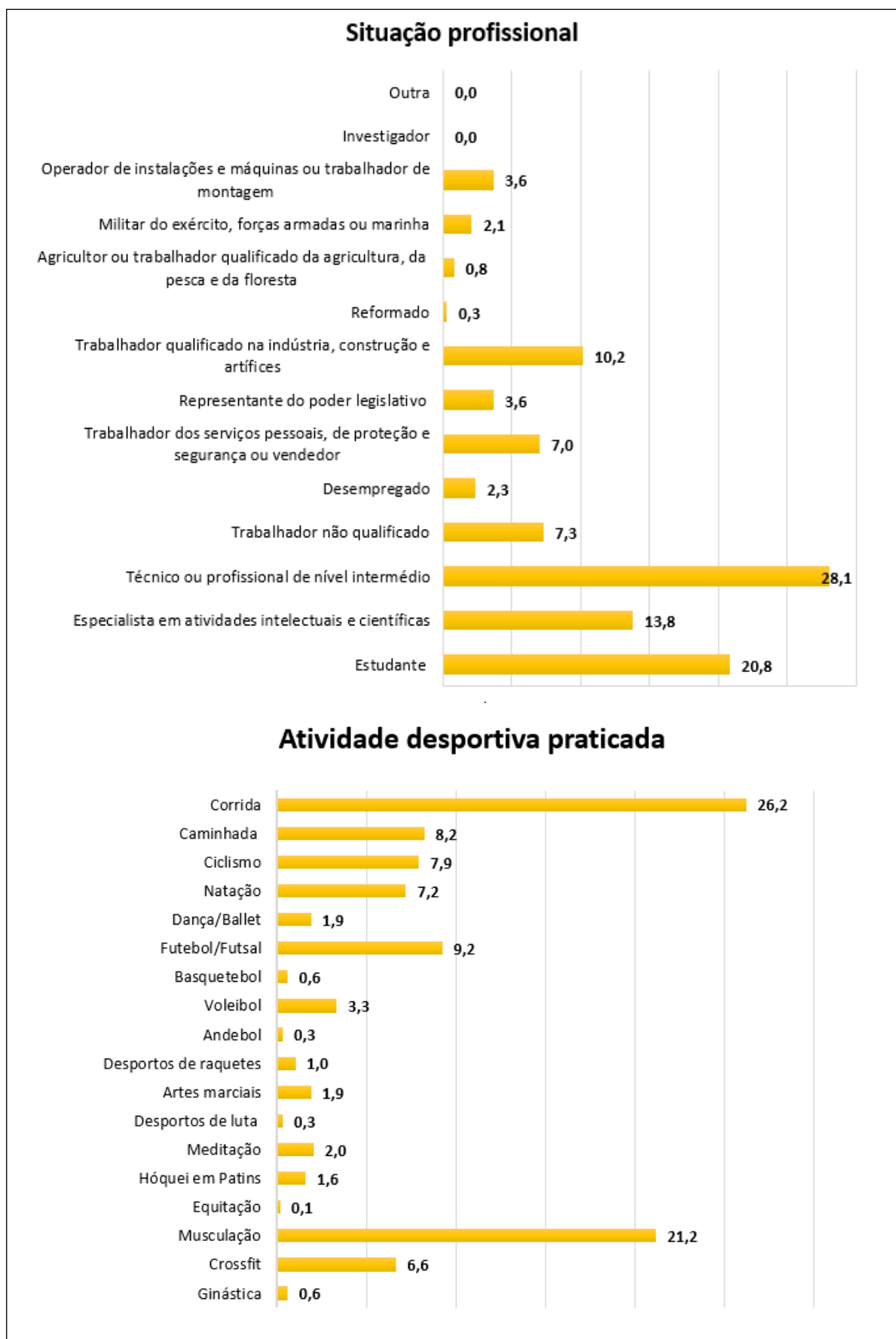
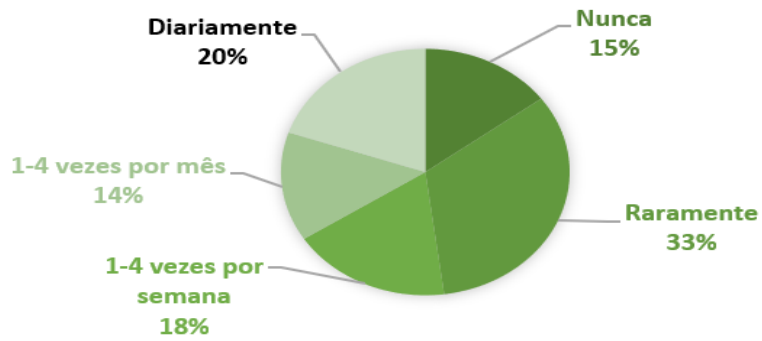
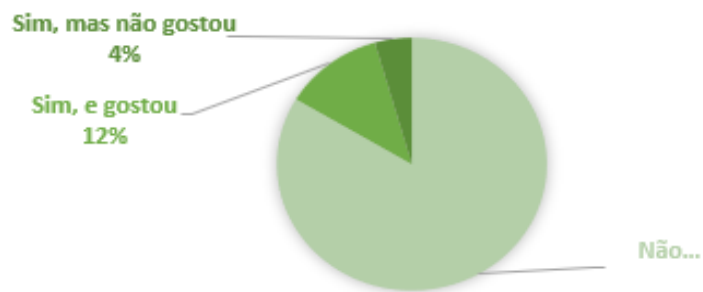


Figura 24: Análise gráfica das respostas às questões 4 e 5, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.

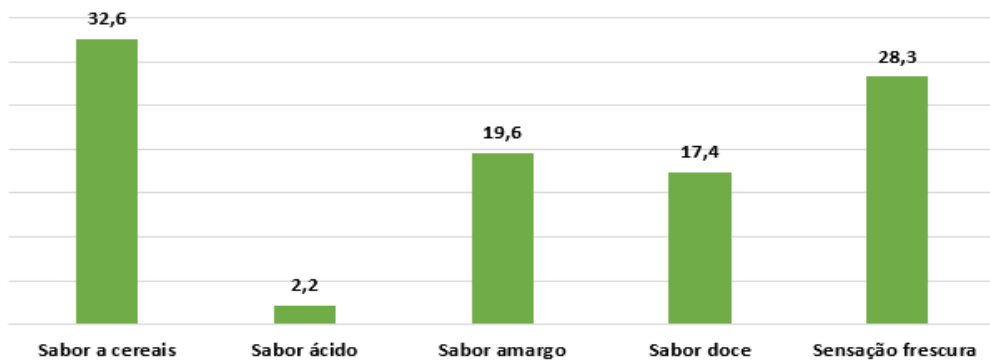
Frequência de consumo de produtos para desportistas



Já ingeriu bebida à base de malte ou mosto de cerveja?



Se provou e gostou, o que mais valorizou?



Se provou mas não gostou, o que menos lhe agradou?

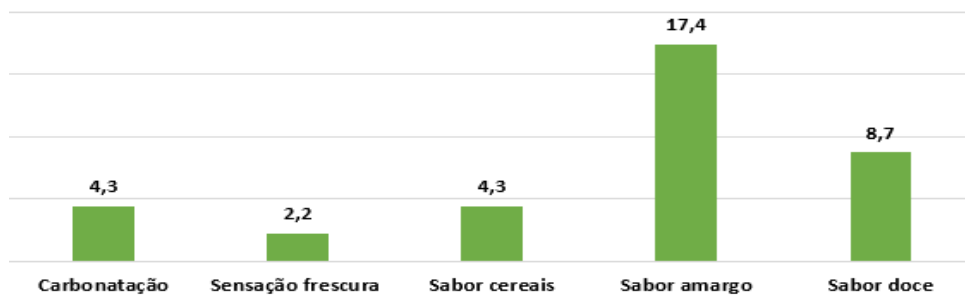
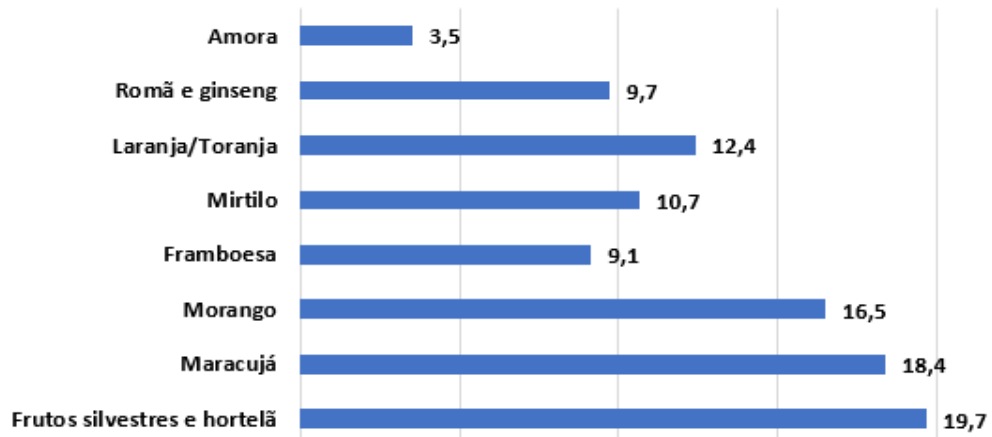
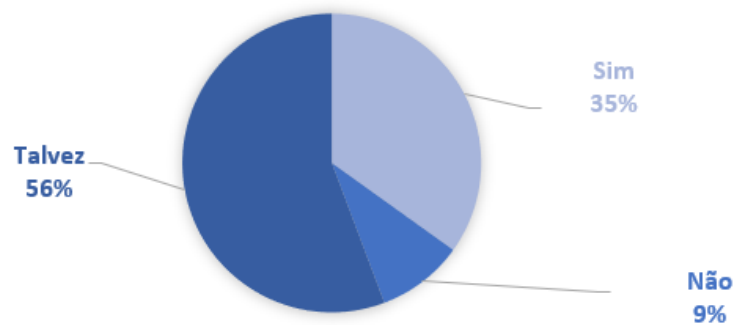


Figura 25: Análise gráfica das respostas às questões 6, 7, 7.1 e 7.2, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.

Sabor preferido para bebida à base de mosto de cerveja



Compraria bebida para desportistas à base de mosto de cerveja?



Quanto pagaria por 33cl dessa bebida?

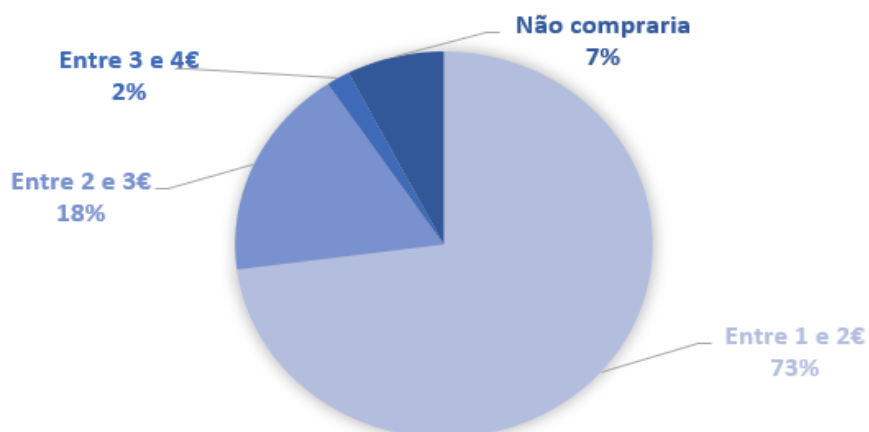


Figura 26: Análise gráfica das respostas às questões 8, 9 e 10, presentes no questionário aplicado ao público-alvo do novo produto.

3.6. Reformulação da ideia

As respostas do questionário aplicado aos supostos potenciais consumidores do produto mostraram uma falta de interesse, por parte dos inquiridos, numa bebida sem álcool, à base de mosto e específica para desportistas, pelo que se voltou atrás no processo de desenvolvimento do novo produto e se tentou gerar uma série de novas ideias. Com isto, acabou por surgir uma nova ideia, a de criar uma bebida inovadora que conseguisse englobar simultaneamente características de um refrigerante, de um repositor hidroeletrolítico e de uma cerveja sem álcool. Tal como um refrigerante, pretendia-se que a nova bebida fosse refrescante, de fácil consumo e que transmitisse o aroma e o sabor de uma fruta. À semelhança de um repositor hidroeletrolítico, pretendia-se que a nova bebida fosse capaz de hidratar o organismo e de fornecer pelo menos algumas das vitaminas, dos minerais e da energia que os praticantes de desporto necessitam. Por último, também era um dos objetivos que, tal como uma cerveja sem álcool, o novo produto possuísse todos os benefícios dos ingredientes base de uma cerveja normal (vitaminas, minerais, compostos polifenólicos, entre outros) e permitisse um consumo responsável, pela ausência de álcool. No fundo, da união de todas estas características perspetivava-se que resultasse um produto mais distinto de tudo aquilo que já existia no mercado alimentar e, como tal, com menor quantidade de produtos concorrentes e maior probabilidade de sucesso.

Assim, tentou-se responder novamente às questões *O quê?*, *Para quem?*, *Quando e Onde?* e *Como?*.

O quê? Resposta: A ideia para o novo produto consiste numa bebida líquida *ready-to-eat* que, à semelhança de uma cerveja sem álcool, seja produzida a partir de mosto de cerveja mas esteja isenta de álcool. Por ser produzida a partir dos ingredientes base de uma cerveja, constituirá uma fonte de energia ideal para pessoas com vidas mais ativas. Esta bebida, de sabor refrescante, e também deverá ser ingerida a uma temperatura de 4-6 °C, será carbonatada e contará com a inclusão de polpa ou sumo de fruta, aproximando-se assim de um refrigerante tradicional e tornando-se sensorialmente mais agradável para os consumidores. Assim, este novo produto enquadra-se na categoria 14.1.4.1 do *Codex Alimentarius*, intitulada de “Bebidas aromatizadas e carbonatadas à base de água” onde se incluem alguns refrigerantes, bebidas energéticas carbonatadas e outras bebidas [55].

Para quem? Resposta: Por ser saudável, refrescante e isenta de álcool, a nova bebida está perfeitamente adaptada a um consumo quotidiano, por qualquer pessoa e em qualquer ocasião. No entanto, destina-se essencialmente a pessoas ativas e descontraídas, que frequentam ambientes também descontraídos.

Quando e Onde? Resposta: A bebida será fabricada e comercializada durante todo o ano, e poderá ser encontrada nas grandes superfícies comerciais (como Continente, Pingo Doce, Auchan, Lidl e Mercadona), em postos de abastecimento de combustível e máquinas de *vending*, em lojas de produtos alternativos como o Celeiro, no canal HORECA (hotéis, restaurantes e cafés) e no *brewpub* da empresa.

Como? Resposta: A matéria-prima de partida para o desenvolvimento desta nova bebida também será o mosto utilizado no fabrico da Vadia Orgânica, não para que no final se possa obter uma bebida com certificação biológica por se considerar que o custo extra associado ao fabrico desse produto não seria tão valorizado pelo seu público-alvo, mas principalmente pelo facto de esse ser um mosto com aromas frutados (a citrinos e maracujá) e um amargor persistente que, além de contribuir para uma maior sensação de frescura, também deverão equilibrar bem com o sabor e o aroma da fruta adicionada. Portanto, pretende-se começar por produzir o mosto cervejeiro, utilizando exatamente os mesmos ingredientes e os mesmos equipamentos que para o fabrico da Vadia Orgânica. Depois do respetivo mosto ser arrefecido através do permutador de placas, ser-lhe-á adicionado sumo ou polpa de uma fruta, com o principal objetivo de conferir à bebida final alguns dos benefícios nutricionais dessa fruta, mas também um pouco da sua cor, aroma e sabor, tornando assim o produto final mais atrativo para o consumidor. A mistura resultante será diluída com água, e eventualmente adicionada de mais alguns ingredientes ou coadjuvantes tecnológicos (como concentrados, vitaminas, minerais, corantes, aromatizantes, conservantes ou outros), se isso se mostrar necessário. De seguida, o produto será carbonatado, engarrafado e pasteurizado, utilizando os mesmos procedimentos e os mesmos equipamentos que se utilizam para carbonatar, engarrafar e pasteurizar os restantes produtos da marca, mas com o cuidado de lhe atribuir o número mais adequado possível de UP's. Assim, mais uma vez à semelhança do que havia sido referido para o repositório hidroeletrólítico, a tecnologia e os equipamentos necessários para fabricar este produto serão os mesmos que se utilizam para fabricar os restantes produtos da marca, mas a combinação exata dos vários ingredientes e a sua proporção relativa deverão ser afinadas através de testes de formulação, de tal forma que a bebida final seja sensorialmente agradável para o consumidor (em termos de aparência, aroma, sabor e textura), mas também possua estabilidade físico-química e segurança microbiológica.

3.7. Testes de formulação

Antes de se dar início aos testes de formulação com o desenvolvimento dos primeiros protótipos de bancada, tanto o mosto utilizado no fabrico da cerveja Vadia Orgânica como algumas bebidas sem álcool disponíveis no mercado e consideradas mais próximas da bebida a

desenvolver, foram provados pelo painel interno de provadores semi-treinados (responsáveis pelas provas dos produtos da empresa) e submetidos a testes físico-químicos para determinação do seu pH e teor de sólidos solúveis totais, como estimativa do teor de açúcares presentes. As bebidas comercialmente disponíveis que foram sujeitas a análise incluíram três refrigerantes (Coca-cola, Guaraná e Fanta de maracujá sem açúcar), uma água tônica (Schweeps), quatro cervejas sem álcool (Alkoholfrei Erdinger, Heineken 0.0, Sagres Radler 0.0 limão, Sagres Radler 0.0 lima-frutos vermelhos) e uma bebida energética (+Power).

A determinação do pH, por potenciometria, e a determinação do teor de sólidos solúveis totais, por leitura direta no refratômetro digital portátil, foram efetuadas tal como descrito no ponto 1.1.5. *Análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba*, do Capítulo II, efetuando-se um número mínimo de duas medições para cada parâmetro de uma amostra do respetivo produto e anotando-se o primeiro valor que foi igual em duas medições consecutivas.

Os resultados de tais análises (Tabela 9) permitiram estabelecer que a bebida sem álcool deveria apresentar um pH de 3,00-3,50, que seria apenas ligeiramente superior ao pH médio dos refrigerantes (de 3,03) e inferior ao dos restantes produtos analisados, e um teor de sólidos solúveis de 6,00-8,00, que seria ligeiramente inferior ao teor de sólidos solúveis médio dos refrigerantes (de 9,90) e ao da bebida energética mas superior ao teor de sólidos solúveis médio das cervejas sem álcool. Uma vez definida essa gama de valores, deu-se início aos testes de bancada, com o mosto da Vadia Orgânica, água e os sumos dos três sabores que os indivíduos que responderam ao questionário mais gostariam de experimentar numa bebida sem álcool à base de mosto de cerveja e específica para desportistas, por se assumir que esses sabores seriam os preferidos da maior parte das pessoas. Todas as misturas efetuadas foram sendo analisadas quanto ao seu pH e teor de sólidos solúveis (mais uma vez, tal como descrito no ponto 1.1.5. *Análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba*, do Capítulo II) e, quando os valores de ambos os parâmetros se apresentaram dentro da gama estipulada, essas misturas foram provadas pelo painel interno de provadores que, com isso, acabou por escolher um desses sumos. O sumo selecionado foi o de maracujá, essencialmente por ser o que melhor combinava com o mosto da Vadia Orgânica, tornando a bebida menos doce e mais refrescante.

Posto isso, os testes de formulação que se seguiram foram efetuados utilizando diferentes combinações e proporções de um conjunto específico de ingredientes (Tabela 10). Mais uma vez, todos os protótipos desenvolvidos foram sendo testados quanto ao seu pH e teor de sólidos solúveis, de modo a garantir que os valores de ambos os parâmetros se encontravam dentro da gama estabelecida, e posteriormente provados pelo painel interno de provadores, o qual foi selecionando as melhores hipóteses e sugerindo aperfeiçoamentos das mesmas, até se chegar à

formulação que mais agradou a todos, composta por mosto de cerveja, água, sumo de maracujá e concentrado de maçã.

Tabela 9: Resultados das análises físico-químicas (pH e teor de sólidos solúveis) efetuadas a várias bebidas sem álcool, comercialmente disponíveis, e ao mosto utilizado para o fabrico da cerveja Vadia Orgânica.

Categoria de Produto	Produto	pH	pH médio	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Teor de sólidos solúveis médio (°Brix)
Refrigerantes	Coca-cola	2,73	3,03	10,1	9,90
	Guaraná	3,33		9,70	
Cervejas sem álcool	Heineken 0.0	5,60	7,10	4,35	3,80
	Alkoholfrei Erdinger	7,10		4,24	
	Sagres Radler limão	7,70		3,31	
	Sagres Radler lima-frutos vermelhos	8,00		3,31	
Bebidas energéticas	+Power	3,23	---	11,9	---
Mosto de cerveja	Mosto da Vadia Orgânica	4,80	---	13,1	---

Tabela 10: Ingredientes utilizados nos testes de formulação da bebida sem álcool à base de mosto.

Ingredientes utilizados no desenvolvimento de protótipos	
Água	Água mineral natural
Mosto	Mosto da Vadia Orgânica
Sumos	Sumo de limão
	Sumo de maracujá
Concentrados	Concentrado de limão
	Concentrado de maçã
Aroma	Aroma a limão

3.8. Definição do processo

Uma vez definida a formulação do produto, passou-se à definição do seu processo de fabrico, tentando-se reproduzir o mesmo. Inicialmente foi necessário moer o malte e, apenas no dia seguinte, produziram-se cerca de 600 L de mosto seguindo-se as etapas normais: brassagem, filtração para remoção da dreche, ebulição com o lúpulo e arrefecimento do mosto. De seguida transferiu-se o mosto produzido para uma cuba de 1000 L, cujo controlo de temperatura foi ligado e definido para 3 °C. Ao mosto a 3 °C, adicionaram-se 60 L de sumo de maracujá e 20 L de concentrado de maçã. Posto isso, foram-se adicionando volumes repartidos de água, e medindo o pH e teor de sólidos solúveis da mistura (tal como descrito no ponto *1.1.5. Análise de parâmetros físico-químicos dos produtos em cuba*, do Capítulo II) entre esses volumes, até perfazer um volume total de 300 L de água, que foi quando se alcançaram os valores de pH e teor de sólidos solúveis estipulados para a bebida.

No dia seguinte a bebida foi carbonatada tal como se descreveu no ponto *1.1.2. Carbonatação*, do Capítulo II, e depois disso foi engarrafada e pasteurizada. Ao longo desta pasteurização, a velocidade da passadeira e a temperatura da água quente no interior do pasteurizador de túnel foram iguais às que se utilizaram na empresa para a pasteurização de limonadas, pelo facto de se considerar que a composição das duas bebidas deveria ser semelhante. Então algumas garrafas foram colocadas no frigorífico para refrescarem e poderem ser provadas. Contudo, algumas horas depois, percebeu-se que todas as garrafas tinham uma quantidade significativa de depósito no fundo e, ao agitar, formava-se um líquido muito turvo, que era visualmente pouco atrativo. Assim, alguns dias depois este processo de fabrico do produto foi repetido mas acrescentou-se uma etapa de filtração, tal como descrito no ponto *1.1.1. Filtração*, do Capítulo II, antes da carbonatação. Desta forma já se conseguiu obter um produto que, no final do mesmo período, não apresentou tanto depósito.

O processo de fabrico da bebida sem álcool foi assim definido como englobando as seguintes etapas principais: Moagem do malte, brassagem, filtração para remoção da dreche, ebulição do mosto com o lúpulo, arrefecimento do mosto fervido, adição do sumo de maracujá, concentrado de maçã e água, filtração da mistura, carbonatação, enchimento e pasteurização (Figura 27).

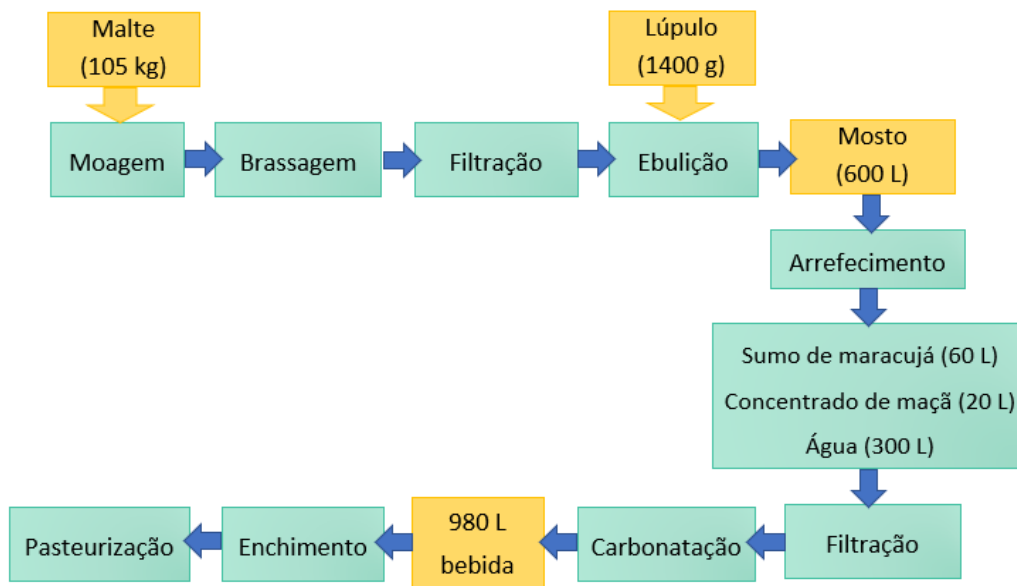


Figura 27: Processo de fabrico da bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja e com sabor a maracujá.

4. Metodologias para caracterização do produto

Depois da formulação e do processo de fabrico da nova bebida estarem definidos, esta foi produzida numa escala maior e procedeu-se à sua caracterização através de algumas metodologias que serão abordadas neste ponto.

4.1. Notas introdutórias

Quando se desenvolvem novos produtos alimentares, é muito importante prestar atenção às características desses alimentos, fundamentalmente para garantir a sua qualidade e segurança. Entre as propriedades mais importantes dos alimentos, as quais devem ser regularmente analisadas, destacam-se as suas propriedades sensoriais, físico-químicas e microbiológicas.

4.1.1. Avaliação sensorial

De acordo com Stone e Sidel (2004), e conforme citado por Lawless e Heymann (2010), a avaliação sensorial é um método científico utilizado para evocar, medir, analisar e interpretar as reações às características dos produtos, tal como elas são percebidas pelos sentidos da visão, do olfato, do tato, do paladar e da audição. A avaliação sensorial dos produtos pode ser

efetuada recorrendo a diferentes tipos de testes, sendo que os testes de diferenciação, os testes descritivos e os testes afetivos são os mais amplamente empregues [58].

Os testes de diferenciação, normalmente são realizados com participantes que foram rastreados quanto à sua acuidade sensorial, e têm como objetivo perceber se existe alguma diferença sensorial perceptível entre dois ou mais produtos distintos. Assim, a partir da análise estatística dos resultados, isto é, com base na proporção (acima ou abaixo do esperado pelo acaso) de pessoas capazes de escolher corretamente o produto teste de entre um conjunto de produtos semelhantes, é possível inferir a capacidade de discriminar diferenças entre o produto teste e os restantes [58].

Já os testes descritivos são os testes de avaliação sensorial mais abrangentes e informativos, levados a cabo por um painel de indivíduos que são capazes de caracterizar e quantificar todos os atributos de um produto de acordo com escalas específicas para esses atributos. Normalmente esse painel é constituído por um número relativamente reduzido de membros (cerca de doze), mas que apresentam um elevado nível de experiência. Como eles são conhecedores do significado de cada termo e foram treinados para usar escalas de atributos de forma semelhante, a variação de erro é reduzida e o poder estatístico e a sensibilidade do teste são mantidos [58].

Por último, os testes afetivos, também denominados de testes hedónicos, têm por objetivo determinar o produto preferido pelos consumidores e/ou quantificar o grau de aceitação desses consumidores perante cada um dos produtos apresentados. Normalmente, para a realização destes testes utilizam-se escalas hedónicas que, no fundo, são escalas com propriedades semelhantes a réguas, cujos intervalos iguais são passíveis de análise estatística. Atualmente, um teste deste tipo deve englobar uma amostra de 75 a 150 consumidores que sejam utilizadores regulares daquele tipo de produto, deve envolver várias versões alternativas do produto e deve ser realizado em algum local central ou instalação de teste sensorial. A necessidade de um painel de maior dimensão para a realização de um teste deste tipo deve-se à elevada variabilidade no que diz respeito às preferências individuais e, portanto, à necessidade de aumentar o número de respostas para aumentar a sensibilidade do teste [58].

4.1.2. Análise físico-química e microbiológica

A análise de parâmetros físico-químicos e microbiológicos pode fornecer informações precisas que ajudam a avaliar a segurança, a estabilidade e a qualidade dos alimentos, constituindo assim uma etapa fundamental do processo de DNPA. Análises físico-químicas como a determinação do pH, do teor de humidade, do teor de ácidos gordos livres e totais,

entre outras, são muito úteis na identificação das principais causas de deterioração ou contaminação de um produto e, portanto, na determinação do tempo de vida útil do mesmo.

Já as análises microbiológicas permitem verificar quais e quantos microrganismos estão presentes num determinado produto alimentar, o que por sua vez permite conhecer as condições de higiene em que esse produto foi preparado, se ele terá ou não a vida útil pretendida e os riscos que ele poderá apresentar para a saúde dos seus consumidores. A contaminação pode ser causada por microrganismos deteriorantes, os quais danificam o produto mas não representam qualquer risco para a saúde pública dos seus consumidores, mas também por microrganismos patogénicos, os quais podem causar doenças transmitidas por alimentos que, por sua vez, podem custar às empresas a sua reputação e quantias substanciais de dinheiro. O crescimento de um microrganismo específico num determinado alimento depende de vários fatores como as propriedades físico-químicas desse produto, mas também da sua carga microbiológica inicial, do tipo de processamento que foi utilizado na sua produção, e do ambiente externo a ele próprio, como as condições nas quais ele está armazenado.

4.2. Procedimentos

Neste ponto são apresentados os procedimentos efetuados para caracterização, sensorial, físico-química e microbiológica, do produto.

4.2.1. Avaliação sensorial

Tendo a bebida produzida de acordo com o processo descrito na Figura 27, elaborou-se uma ficha de prova descritiva (Figuras 28 e 29) para que um painel interno de provadores semi-treinados pudesse avaliar os seus atributos sensoriais. A classificação que se pretendia obter para cada um desses atributos era a seguinte: cor laranja vivo; espessura aparente reduzida; depósito praticamente inexistente; aroma acentuado a maracujá; sabor geral bastante refrescante, com um doçura intermédia, acidez moderada e adstringência reduzida; sabor inicial mais intenso a maracujá e de amargor leve, em contraste com um sabor final mais notório a mosto de cerveja e de amargor mais acentuado; espessura na boca reduzida e carbonatação suficiente (Figura 30). Além disso, como é evidente, desejava-se que o produto adquirisse uma classificação global de nível máximo.

Depois de elaborada a ficha de prova descritiva, procedeu-se à realização do teste de avaliação sensorial do produto, o qual foi aplicado a um grupo composto por quatro funcionários da empresa e, por esse motivo, decorreu no brewpub da própria empresa, durante a hora de almoço. A bebida, a uma temperatura de 4-6 °C, foi servida em copos de vidro de

33cl, colocando-se cerca de 15cl em cada copo, de seguida entregou-se um copo a cada funcionário e pediu-se que tentassem responder à ficha de prova descritiva.

Na fase seguinte, também se elaborou uma ficha de prova qualitativa (Figura 31), com o intuito de se avaliar o grau de aceitação da nova bebida por parte dos seus potenciais consumidores. A respetiva ficha de prova foi aplicada em eventos no próprio brewpub da empresa e em festivais como o RunCambra19 (que decorreu nos dias 4 e 5 de Maio, em Vale de Cambra) e o Mercado da Cerveja Artesanal (que decorreu entre os dias 29 de Agosto e 1 de Setembro, no mercado da Vila, em Cascais), de modo a obter-se um elevado número de respostas acerca da nova bebida que fossem representativas da opinião do seu público-alvo. De modo a evitar possíveis constrangimentos ou respostas menos sinceras, que pudessem decorrer do facto dos consumidores saberem que a sua opinião estava a ser avaliada e registada, a respetiva ficha de prova foi preenchida da forma mais discreta possível por quem serviu a bebida, não sendo mostrada aos consumidores.

Ficha de prova descritiva

Bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja e com sumo de maracujá

Nome do provador: _____

À sua frente encontra-se uma amostra de uma bebida à base de mosto de cerveja, com incorporação de sumo de maracujá. Observe-a atentamente, depois cheire-a e prove-a. De seguida classifique cada um dos atributos que se seguem rodeando o valor (de 1 a 5) que mais se adequa na respetiva escala.

Cor

Laranja pálido

Laranja vivo

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

Depósito

Inexistente

Acentuado

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

Espessura aparente

Reduzida

Excessiva

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

Aroma

Mosto de cerveja

Maracujá

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

Sabor

- Intensidade inicial

Mosto de cerveja

Maracujá

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

- Amargor inicial

Leve

Acentuado

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

- Frescura

Nada refrescante

Muito refrescante

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

Figura 28: Página 1 da ficha de prova descritiva aplicada a um painel interno de provadores semi-treinados.

- Doçura

Nada doce Muito doce

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

- Acidez

Nada ácida Muito ácida

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

- Adstringência

Nada adstringente Muito adstringente

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

- Intensidade final

Mosto de cerveja Maracujá

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

- Amargor final

Leve Acentuado

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

Espessura na boca

Reduzida Excessiva

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

Carbonatação

Insuficiente Excessiva

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

Classificação global

Péssima Ótima

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

Figura 29: Página 2 da ficha de prova descritiva aplicada a um painel interno de provadores semi-treinados.

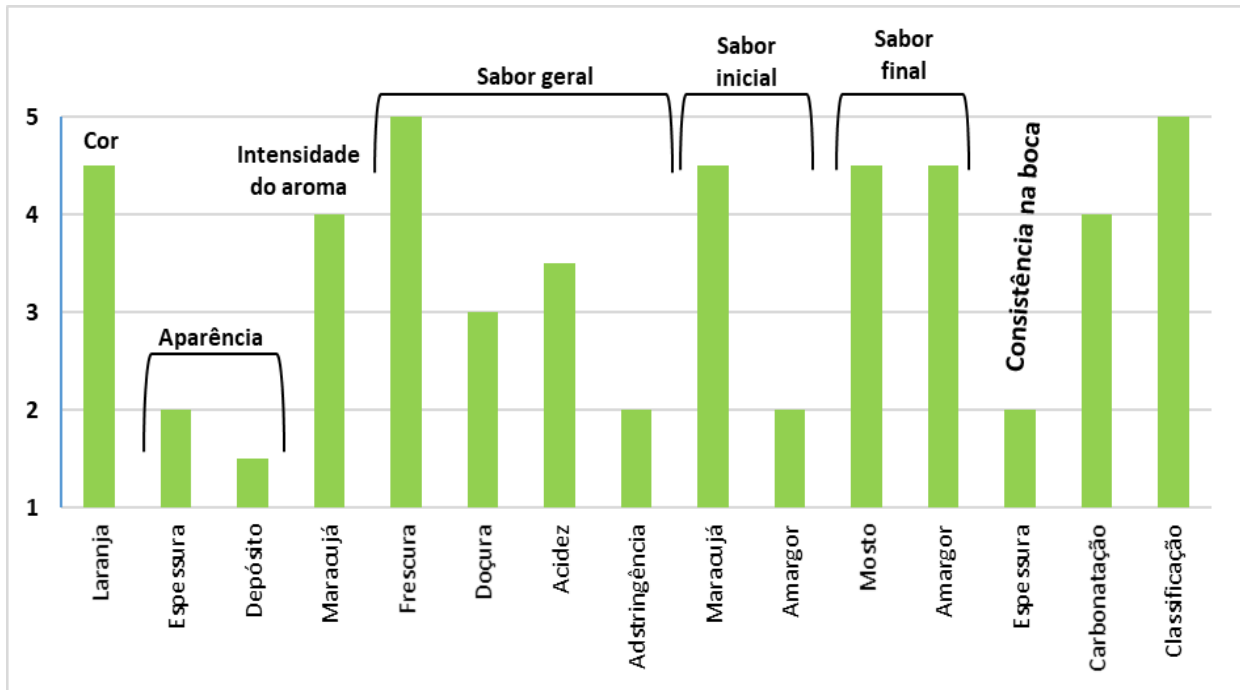


Figura 30: Classificação desejada para os atributos da bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja e com incorporação de sumo de maracujá, numa escala de 1 a 5, em que 1 representa o nível mínimo e 5 representa o nível máximo do respetivo atributo.

**Ficha de prova qualitativa para avaliação do novo produto
pelos consumidores**

Bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja e com sumo de maracujá

Género:

- Masculino
- Feminino

Idade aproximada:

- Menos de 18
- Entre 18 e 30
- Entre 30 e 50
- Mais de 50

Gostou da bebida?

- Sim
- Não

Se gostou da bebida, estaria disposto a comprá-la?

- Sim
- Não
- Talvez

Caso não tenha gostado da bebida, qual foi o motivo?

O sabor combina com o conceito? É o que esperava?

Comentários ou sugestões feitas:

--

Figura 31: Ficha de prova qualitativa aplicada aos potenciais consumidores do novo produto.

4.2.2. Análise físico-química

A bebida obtida de acordo com o processo descrito na Figura 27 também foi submetida a uma série de análises físico-químicas (Tabela 11), algumas delas efetuadas na cervejaria e outras na Silliker Portugal, S.A., sendo esta uma empresa com cerca de 160 ensaios laboratoriais, na área química e microbiológica, acreditados pelo IPAC.

Tabela 11: Parâmetros físico-químicos (e respetivos métodos de análise) utilizados, na cervejaria ou na empresa Silliker Portugal, S.A., para caracterização da nova bebida. HPLC = Cromatografia líquida de elevada resolução.

	Essência d'Alma, Lda		Silliker Portugal S.A.		
Parâmetro	pH	Teor de sólidos solúveis	Teor de hidratos de carbono	Teor de açúcares componentes	Teores de sódio e de potássio
Método de análise	Potenciometria	Refratometria	Cálculo	HPLC, com detetor de índice de refração	Espetrofotometria de absorção atómica, com chama

Na cervejaria, dada a ausência de reagentes ou equipamentos que permitissem efetuar outro tipo de ensaios, analisou-se apenas o pH e também o teor de sólidos solúveis, como estimativa do teor de açúcares presentes.

A determinação do pH foi efetuada por potenciometria, com recurso a um eletrodo de pH digital edge® (HI10480 da marca Hanna Instruments) com sensor de temperatura incorporado. Em cada análise, o eletrodo de pH foi mergulhado na respetiva amostra, até cobrir completamente a sua junção, aguardou-se cerca de 1 minuto e anotou-se o valor de pH indicado no mostrador quando este estabilizou por pelo menos 3 segundos. Para cada amostra, foram efetuadas pelo menos duas medições de pH, aceitando-se o primeiro valor obtido que foi igual em duas medições consecutivas. Entre cada duas amostras e no final desta análise, o eletrodo foi lavado com água em abundância para remover todas as manchas.

A determinação do teor de sólidos solúveis totais (em ° Brix), como estimativa da quantidade de açúcares ainda presentes, foi realizada através da leitura direta num refratómetro digital portátil (HI96813 da marca Hanna Instruments), um instrumento ótico que se baseia na medição do índice refrativo de uma solução. com o auxílio de uma pipeta

de plástico encheu-se o recipiente destinado à amostra com aproximadamente 4 gotas da amostra a ser analisada e, após se pressionar a tecla READ, anotou-se o valor de ° Brix indicado no mostrador. Para cada amostra analisada foram efetuadas pelo menos duas medições, aceitando-se o primeiro valor obtido que foi igual em duas medições consecutivas. Entre cada duas amostras e no final de todas as análises de teor de sólidos solúveis pretendidas, o recipiente do refratómetro que conteve as amostras foi seco com um tecido macio, enxaguado com água destilada e novamente seco com um tecido macio.

Já no laboratório da Silliker Portugal, S.A. efetuou-se uma série de análises químicas, de onde se destaca a determinação do teor de hidratos de carbono, do teor de açúcares componentes (frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose) e ainda dos teores de sódio e potássio.

A determinação dos teores de sódio e potássio foi efetuada por espectrofotometria de absorção atómica (EAA) com chama. A EAA trata-se de um método de análise muito utilizado para determinar qualitativa e quantitativamente a presença de determinados elementos numa ampla variedade de amostras. De facto, a elevada sensibilidade deste método, torna-o adequado para a análise de microelementos ou de elementos vestigiais, que possam estar presentes nas amostras como impurezas ou como elementos normais [59]. Para a sua concretização, um volume da amostra é aspirado até um nebulizador e, ao atravessar esse nebulizador, é convertido num aerossol. De seguida, o aerossol é transportado até um atomizador que deve possuir energia suficiente para vaporizar e para atomizar essa amostra, isto é, para convertê-la em átomos livres no estado gasoso. Então, alguns desses átomos gasosos no seu estado fundamental (de menor energia) podem absorver radiação eletromagnética com um comprimento de onda específico, passando assim para o estado excitado (de maior energia). Posteriormente, medindo-se a quantidade de radiação com um determinado comprimento de onda que foi absorvida por esses átomos, é possível determinar a quantidade de um determinado elemento na respetiva amostra [59]. Quanto ao tipo de atomizador mais adequado, ele deve ser selecionado tendo em conta o estado físico (sólido ou líquido) da amostra que se pretende analisar, a quantidade de amostra disponível e a concentração do analito que se quer detetar nessa mesma amostra, mas os mais utilizados são a chama e o forno de grafite. As técnicas que utilizam o forno de grafite apresentam maior sensibilidade que as técnicas que utilizam a chama e, por esse motivo, as primeiras são mais utilizadas para medir elementos que estão presentes na ordem das µg/L e as últimas para medir elementos que estão presentes na ordem das mg/L [59], como foi o caso da determinação do teor de sódio e potássio numa amostra da nova bebida.

Já a determinação dos açúcares componentes (frutose, glucose, sacarose, maltose e lactose) foi efetuada por HPLC, com um detetor de índice de refração. O HPLC é um método de separação extremamente eficiente pois, num curto período de tempo, permite separar, detetar e quantificar os vários analitos de uma mistura contendo um grande número de analitos semelhantes [60]. Para efetuar essa separação, a amostra tem de ser distribuída entre uma fase estacionária e uma fase móvel (eluente), no interior de uma coluna cromatográfica. Geralmente, a fase estacionária é um material sólido e poroso, com atividade superficial, que está aderido ao interior da coluna cromatográfica, enquanto a fase móvel é um líquido que é forçado a atravessar essa coluna. Além disso, a eluição pode ser feita mantendo sempre o mesmo eluente (eluição isocrática), ou variando a sua composição ao longo do tempo (eluição com gradiente) [60]. Assim, uma unidade de HPLC deverá possuir pelo menos os seguintes componentes (Figura 32): (1) um reservatório contendo o eluente, (2) uma linha de transferência, (3) uma ou mais bombas (com manómetro) para empurrar o eluente, (4) uma válvula de injeção onde se coloca a amostra a separar, (5) uma coluna cromatográfica (com termostato) revestida no seu interior por uma fase estacionária, (6) um detetor, (7) um reservatório para recolha dos resíduos e (8) um sistema de aquisição de dados [60].

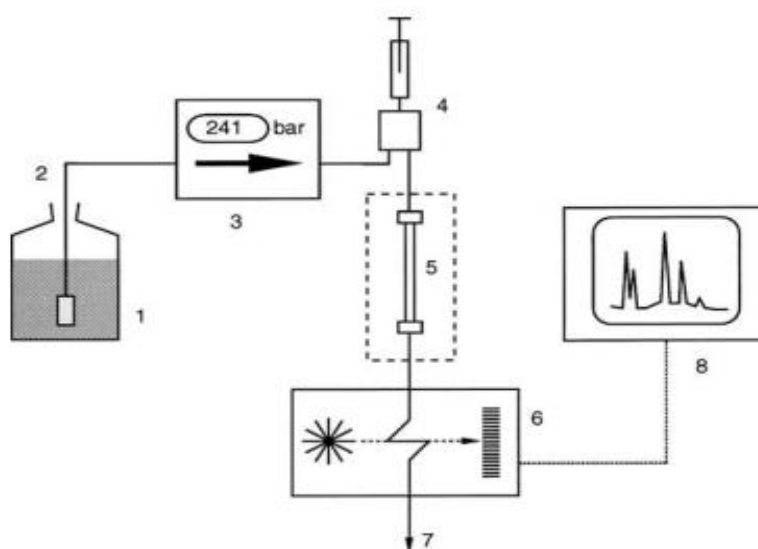


Figura 32: Principais componentes de uma unidade de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC): 1) reservatório de eluente, 2) linha de transferência, 3) bomba, 4) válvula de injeção, 5) coluna cromatográfica, 6) detetor, 7) reservatório para resíduos e 8) sistema de aquisição de dados. Adaptado a partir de [60].

Quanto ao funcionamento desta técnica, em primeiro lugar a(s) bomba(s) deverão assegurar a passagem de um caudal controlado do eluente ao longo dos diversos componentes do sistema cromatográfico. Posto isso, com o auxílio de uma seringa, a amostra é introduzida no loop da válvula de injeção que tem o seu manípulo na posição de carga (*load*). De seguida, ao rodar esse manípulo para a posição de injeção (*inject*), a amostra é então arrastada para a coluna cromatográfica à custa do eluente. Como os diferentes componentes (analitos) da amostra vão interagir de forma diferente com as fases móvel e estacionária, eles vão deslocar-se ao longo da coluna a velocidades também diferentes, eluindo da mesma separados uns dos outros. Após sair da coluna, esses analitos vão passar através de um detetor, o qual envia ao sistema de aquisição de dados um sinal que é proporcional à concentração do componente que o está a atravessar nesse preciso momento. No fundo, o detetor deve conseguir detetar qualquer alteração na composição da fase móvel que o está a travessar, decorrente da presença de um determinado composto nessa fase, depois deve converter essa alteração num sinal elétrico e deve transmitir esse sinal elétrico ao sistema de aquisição de dados [60]. Por exemplo, um detetor de índice de refração, como o que foi utilizado para determinar os teores de sódio e potássio numa amostra da nova bebida, deteta todas as zonas de eluição que possuem um índice de refração diferente do da fase móvel pura, e é essa diferença no índice de refração que ele converte num sinal elétrico. Desta forma, no sistema de aquisição de dados gera-se um cromatograma da respetiva amostra, isto é, uma representação gráfica dos vários sinais que foram enviados pelo detetor ao sistema de aquisição de dados, em função do tempo que decorreu desde a injeção da amostra na coluna até à sua passagem pelo detetor. Esse cromatograma fornece informações qualitativas e quantitativas, pois cada composto da mistura possui um tempo de eluição específico, que dá origem ao aparecimento de um sinal (desvio da linha de base) num momento também específico, e a área por baixo de cada sinal é proporcional à quantidade da substância correspondente [60].

Quanto ao teor de hidratos de carbono, este foi determinado por cálculo, através da Equação 5.

$$\begin{aligned} & \textit{Teor de hidratos de carbono (g/L)} \\ & = (\textit{Extrato real (g/100g)} - \textit{Proteina (g/100g)} \\ & \quad - \textit{Cinza (g/100g)}) \times \textit{Massa volúmica dos hidratos de carbono} \end{aligned}$$

(Equação 5)

4.2.3. Análise microbiológica

O produto pasteurizado também foi submetido a uma série de análises microbiológicas, todas elas efetuadas na Silliker Portugal, S.A. Tais análises incluíram a contagem de *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa indicadora de contaminação fecal, e a contagem de Estafilococos coagulase positiva, onde se inclui *Staphylococcus aureus* que é uma bactéria Gram-positiva produtora de enterotoxinas responsáveis por intoxicações alimentares (Tabela 12), como a seguir se descreve.

Tabela 12: Parâmetros microbiológicos (e respetivos métodos de análise) utilizados, na empresa Silliker Portugal, S.A., para caracterização da nova bebida. TBX = Tryptone Bile X-glucuronide.

Parâmetro	Método de análise
Contagem de <i>E. coli</i>	ISO 6888-2:1999: Contagem de colónias em meio cromogénico TBX
Contagem de estafilococos coagulase positiva	ISO 16649-2:2001: Contagem de colónias em meio de fibrinogénio do plasma de coelho

No que diz respeito à contagem de *E. coli*, esta foi efetuada de acordo com a norma ISO 16649-2:2001 “Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase positive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide”, que permite a contagem de *E. coli* β -glucuronidase positiva em produtos destinados ao consumo humano ou à alimentação animal [61]. Para tal, placas duplicadas contendo um meio cromogénico TBX (Tryptone Bile X-glucuronide) são inoculadas com um volume específico da amostra inicial. Posteriormente, diluições decimais dessa mesma amostra também são utilizadas para inocular duas placas por cada diluição. Após solidificação, todas as placas são incubadas a 44 °C \pm 1 °C durante 18 a 24 h e, após esse período de tempo, examinadas para detetar a presença de colónias que são consideradas de *E. coli* β -glucuronidase positiva, ou seja, colónias que nas condições referidas adquirem uma cor azul típica. Por fim, determina-se o número de unidades formadoras de colónias (UFC) de *E. coli* β -glucuronidase positiva, por grama ou por mililitro de amostra, de acordo com a Equação 6 [61].

$$N = \frac{\sum c}{V(n1 + 0,1n2)d}$$

(Equação 6)

Sendo: $\sum C$, a soma das colónias contadas em duas placas contendo duas diluições sucessivas da amostra; V , o volume de inóculo em cada placa, em mililitros; n_1 , o número de placas selecionadas da primeira diluição; n_2 , o número de placas selecionadas da segunda diluição; d , a diluição correspondente à primeira diluição selecionada. No caso de não serem detetadas colónias, o resultado deve ser indicado como “menor que $1 \times d$ por mililitro” ou “menor que $1 \times d$ por grama”.

No que diz respeito à contagem de Estafilococos coagulase positiva, esta foi efetuada de acordo com a norma ISO 6888-2:99 “Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) — Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium”, que permite a contagem de estafilococos coagulase positiva em produtos destinados ao consumo humano ou à alimentação animal, por contagem das colónias obtidas num meio sólido (meio fibrinogénio do plasma de coelho) após incubação aeróbia a 35 °C ou 37 °C [62]. Para tal, placas duplicadas contendo um meio de agar de fibrinogénio de plasma de coelho, são inoculadas com um volume específico da amostra inicial. Posteriormente, diluições decimais dessa mesma amostra também são utilizadas para inocular duas placas por cada diluição. Após solidificação, todas as placas são incubadas a 35 °C ou 37 °C durante 18 a 24 h e, após esse período de tempo, a partir do número típico dessas colónias por placa de Petri, determina-se o número de estafilococos coagulase positiva, por grama ou por mililitro de amostra, de acordo com a Equação 7 [62].

$$a = \frac{b^c}{A^c} \times C^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times C^{nc}$$

(Equação 7)

Sendo: A^c , o número de colónias características; A^{nc} , o número de colónias não características repicadas; b^c , o número de colónias características de Estafilococos presumíveis que são coagulase positiva; b^{nc} , o número de colónias não características de estafilococos presumíveis que são coagulase positiva; C^c , o número total de colónias características de Estafilococos coagulase positiva presumíveis por placa; C^{nc} , o número total de colónias não características de Estafilococos coagulase positiva presumíveis por placa.

4.3. Resultados e sua discussão

Neste ponto são apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir dos procedimentos aplicados para caracterização sensorial, físico-química e microbiológica do produto.

4.3.1. Avaliação sensorial

Os resultados do teste sensorial descritivo foram os que se seguem: cor laranja vivo; espessura aparentemente reduzida; depósito praticamente inexistente; aroma a maracujá bastante intenso; espessura na boca também reduzida; carbonatação suficiente; e sabor geral bastante agradável e refrescante, com um equilíbrio entre a doçura do malte e a acidez do maracujá, deixando ainda um ligeiro amargor no fim de boca; a classificação global atribuída ao produto final foi de 4 (Figura 33). Tais resultados foram bastante próximos dos que se tinham perspectivado antes da concretização do teste. Contudo, o respetivo teste foi efetuado por quatro funcionários da empresa que, apesar de serem os responsáveis por provar os produtos fabricados na empresa, podiam não possuir o mesmo nível de treino, não conseguindo assim utilizar as escalas de atributos de forma semelhante. Além disso, a inexistência de cabines individuais de prova fez com que os funcionários que participaram no teste conseguissem observar as reações uns dos outros e até mesmo comunicar entre si.

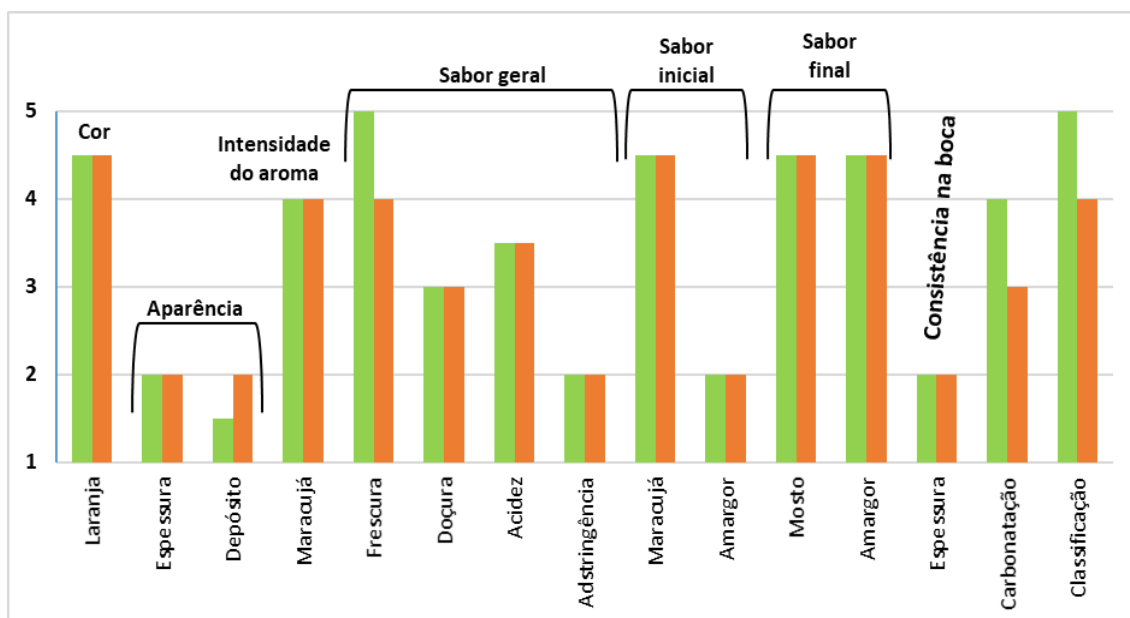


Figura 33: Classificação desejada (a verde) e obtida (a laranja), por aplicação da ficha de prova descritiva, para os atributos de bebida sem álcool, à base de mosto e com sumo de maracujá, numa escala de 1 a 5, em que 1 representa o nível mínimo e 5 representa o nível máximo do respetivo atributo.

O ambiente descontraído em que o teste foi realizado, bem como o facto dos participantes se conhecerem entre si e já estarem minimamente familiarizados com o produto que estavam a analisar, pode ter feito com que as suas respostas tenham sido menos sinceras.

Quanto ao teste sensorial qualitativo (Figura 34), a bebida foi provada por cerca de cem pessoas, sendo aproximadamente 55 % do género masculino e 45 % do género feminino, e a maioria com idades compreendidas entre os 18 e os 30 anos. Ao provar, apenas duas senhoras mostraram uma expressão facial de completo desgosto, e afirmaram não gostar da bebida por esta deixar um sabor demasiado amargo no final. Um indivíduo do género masculino também afirmou não gostar muito do sabor da bebida por este lhe fazer lembrar mais um refrigerante que uma cerveja.

**Ficha de prova qualitativa para avaliação do novo produto
pelos consumidores**

Bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja e com sumo de maracujá

Género:

Masculino
 Feminino

Idade aproximada:

Menos de 18
 Entre 18 e 30
 Entre 30 e 50
 Mais de 50

Gostou da bebida?

Sim
 Não

Se gostou da bebida, estaria disposto a comprá-la?

Sim
 Não
 Talvez

Caso não tenha gostado da bebida, qual foi o motivo?
Sabor amargo no final

O sabor combina com o conceito? É o que esperava?
É mais refrescante e sente-se mais o sabor e aroma ao maracujá do que esperava

Comentários ou sugestões feitas:

Figura 34: Resultados obtidos com maior frequência por aplicação da ficha de prova qualitativa aos potenciais consumidores do novo produto.

Dos restantes indivíduos cujas declarações e expressões faciais revelaram agrado pelo produto, cerca de 30 % asseguraram que comprariam a bebida se a encontrassem à venda, e os restantes afirmaram que talvez a comprassem. No geral, os aspetos que os consumidores mais gostaram foram a sensação de frescura e o aroma a maracujá; muitos também referiram que na boca conseguiram sentir o sabor de um refrigerante, mas no final sentiram o trazo amargo habitual de uma cerveja e que isso lhes agradou.

4.3.2. Análise físico-química

Os resultados de todas as análises físico-químicas efetuadas ao produto final pela Silliker Portugal S.A. encontram-se reunidos na Tabela 13. A partir da análise dessa tabela é possível verificar que o teor de carboidratos determinado foi de 83 g/L, valor esse que está muito próximo da gama de teores de carboidratos (60-80 g/L) recomendada para uma bebida poder funcionar como um repositivo hidroeletrólítico adequado para desportistas. Além disso, desse teor de carboidratos, cerca de 52,8 g/L diziam respeito a açúcares e, desses, 11,4 g/L diziam respeito a glucose, cujo teor numa bebida de reposição hidroeletrólítica deverá ser inferior a 50 g/L. Com isto, é possível concluir que a bebida desenvolvida possui um teor de carboidratos, incluindo glucose, que são compatíveis com os requisitos de um repositivo hidroeletrólítico capaz de conferir benefícios físicos e nutricionais a desportistas. No entanto, o seu teor de sódio, que foi de 28 mg/L, ficou bastante aquém do recomendado para tal, que é de pelo menos 400 mg/L.

Tabela 13: Resultados das análises físico-químicas efetuadas ao produto, na Silliker Portugal, S.A. LQ = Limite de quantificação.

	Essência d'Alma, Lda		Silliker Portugal S.A.			
Parâmetro	pH	Teor de sólidos solúveis (°Brix)	Teor de hidratos de carbono (g/L)	Teor de açúcares componentes (g/L)	Teor de sódio (mg/L)	Teor de potássio (g/kg)
Resultado	3,30	7,5	83	52,8 (Lactose, Sacarose < LQ; Frutose = 15,3; Maltose = 26,1; Glucose = 11,4)	28	0,93

4.3.3. Análise microbiológica

Os resultados de todas as análises microbiológicas efetuadas ao produto final pela Silliker Portugal S.A. podem ser consultados na Tabela 14 e permitem constatar que os microorganismos pesquisados e/ou contados estavam presentes nas amostras em teores tão baixos (inferiores a 1 UFC/mL) que não representam qualquer risco para a saúde pública. Com isto é exequível concluir que todos os cuidados de higiene foram cumpridos, tanto no manuseamento das matérias-primas como no fabrico do produto, e que a respetiva bebida pode ser comercializada de forma segura.

Tabela 14: Resultados das análises microbiológicas efetuadas ao produto pela Silliker Portugal, S.A.

Parâmetro	Resultado da análise
Contagem de <i>E. coli</i> (UFC/mL)	< 1
Contagem de estafilococos coagulase positiva (UFC/mL)	< 1

Capítulo IV – Conclusões

O estágio curricular inserido no âmbito desta dissertação de mestrado foi desenvolvido na empresa Essência d'Alma, Lda, tendo por base dois grandes objetivos: por um lado a aquisição de conhecimentos e competências ao nível do processo cervejeiro e, por outro lado, o desenvolvimento de uma nova bebida sem álcool e à base de malte.

O primeiro grande objetivo foi conseguido através da participação nas atividades diárias da empresa, nomeadamente nas várias etapas dos processos de produção e enchimento, mas também no controlo de qualidade dos produtos, na higienização dos materiais e equipamentos e também, um pouco, em atividades mais relacionadas com logística, como receção de matérias-primas e gestão e controlo de stocks. Esta participação permitiu-me perceber que o processo cervejeiro implica a existência de um conjunto de matérias-primas e também a realização de uma série de etapas que devem ser rigorosamente controladas e monitorizadas, uma vez que pequenas variações, seja nos ingredientes ou nas condições do processo, são suficientes para levar à obtenção de produtos completamente diferentes. Por outro lado, esse aspeto possibilita a obtenção de uma variedade infinita de produtos que, por uma ou outra característica, conseguem agradar a praticamente todas as pessoas.

O segundo grande objetivo deste estágio vai de encontro a isso, pois a partir dos ingredientes base da cerveja, e realizando algumas etapas do processo cervejeiro, como a maltagem, a brassagem e a fervura do mosto, foi possível obter um produto completamente diferente. Trata-se de uma bebida que vai de encontro às principais tendências de mercado por estar enquadrada no conceito de produto *on-the-go*, por ser 100 % vegetal e por permitir um consumo responsável, devido à ausência de álcool, apesar de conter os ingredientes base de uma cerveja. Além disso, a sua leve carbonatação e o seu sabor refrescante, com um equilíbrio entre a acidez do maracujá e a doçura do malte, fazem desta uma bebida de fácil consumo, à semelhança de um refrigerante. Mais ainda, a bebida desenvolvida possui um pH de 3,30, um teor de sódio de 28 mg/L e um teor de carboidratos de 83 g/L, dos quais 52,8 g/L dizem respeito a açúcares e, desses, 11,4 g/L dizem respeito a glucose, pelo que o seu teor de carboidratos, nomeadamente de glucose, é compatível com os requisitos de um repositor hidroeletrólítico, mas o seu teor de sódio está bastante aquém do recomendado para tal. Desta forma, é verossímil afirmar que o novo produto conseguiu cumprir o objetivo inicial de se desenvolver uma bebida que englobasse simultaneamente características de cerveja sem álcool, de refrigerante e de repositor hidroeletrólítico. Trata-se portanto de uma bebida sem álcool, com sabor a maracujá, denominada *Vadia 100*, que

foi recentemente introduzida no mercado e que está apta a ser consumida por indivíduos de ambos os géneros e também por todos aqueles que seguem uma alimentação vegetariana, apesar de se destinar essencialmente a pessoas ativas e descontraídas, que gostam de se manter ocupadas e de socializar com os outros, frequentando ambientes também descontraídos.

O desenvolvimento desta bebida permitiu compreender muitos dos desafios que as empresas enfrentam no momento de desenvolver novos produtos com potencial de sucesso no mercado. Num mercado tão competitivo como o que se verifica atualmente, para uma empresa conseguir sobreviver e prosperar ela tem de estar constantemente a desenvolver e a colocar novos produtos no mercado. Contudo, estando os consumidores cada vez mais consistentes, mais informados e mais exigentes, desenvolver novos produtos que agradem a esses consumidores é um desafio cada vez maior. Ainda assim, foi possível passar pelas principais etapas do processo de desenvolvimento de novos produtos e chegar a um produto final seguro, com as características pretendidas e que agradou tanto ao painel interno de provadores como aos consumidores em geral.

De salientar ainda que o empenho da Essência d'Alma em alertar a sociedade para a importância da prática desportiva, como forma das pessoas se manterem ativas e saudáveis, tem sido notório ao longo do tempo, pois são cada vez mais e mais frequentes os eventos relacionados com desporto que são organizados por esta entidade ou que, não sendo organizados pela mesma, contam com o seu apoio e com a sua participação. Exemplos disso são o VougaTrail, o Vadia Skyrace, o Vadia Extreme Trail e o RunCambra, entre outros. Assim, a presença da *Vadia 100* no portefólio de produtos desta empresa, faz ainda mais sentido. No futuro, é essencial acompanhar a evolução desta bebida no mercado, tentar prolongar ao máximo o seu período de vendas e continuar a apostar na inovação e no desenvolvimento de novos produtos, por exemplo através do lançamento no mercado da *Vadia 100* com um novo sabor.

Bebida sem álcool com sabor a maracujá
Bebida nutritiva e refrescante, ideal para pessoas com vidas ativas

Se te preocupas em seguir uma alimentação saudável, mas anseias por experiências novas e deliciosas, esta é a bebida ideal para ti.

A Vadia 100 oferece os benefícios dos nutrientes base de uma cerveja, e é uma fonte de energia ideal para pessoas que vivem numa constante correria. É produzida exclusivamente a partir de ingredientes de origem vegetal, estando assim apta a ser consumida por vegetarianos. Além disso, não possui quaisquer conservantes, corantes nem aromas artificiais, mas é garantido que o seu sabor e aroma naturais não vão deixar ninguém indiferente.

Vadia 100... 100% energia, sem álcool, sem comparação.

Não percas: em garrafas de 33cl, já nas prateleiras do hipermercado mais próximo de ti!




Figura 35: Pitch para apresentação da nova bebida, *Vadia 100*, sem álcool e com sabor a maracujá.

Referências bibliográficas

1. Fuller, G.W., *New food product development: from concept to marketplace*. 2016: CRC Press.
2. Sarris, D. and S. Papanikolaou, *Biotechnological production of ethanol: biochemistry, processes and technologies*. Engineering in life sciences, 2016. **16**(4): p. 307-329.
3. Aramouni, F. and K. Deschenes, *Methods for developing new food products: An Instructional Guide*. 2014: DEStech Publications, Inc.
4. Hornsey, I.S., *A history of beer and brewing*. Vol. 34. 2003: Royal Society of Chemistry.
5. Sánchez, F., et al., *The possible roles of ethanol in the relationship between plants and frugivores: first experiments with Egyptian fruit bats*. Integrative and Comparative Biology, 2004. **44**(4): p. 290-294.
6. Kok, Y.J., et al., *Brewing with malted barley or raw barley: what makes the difference in the processes?* Applied microbiology and biotechnology, 2018: p. 1-9.
7. Esslinger, H.M., *Handbook of brewing: processes, technology, markets*. 2009: John Wiley & Sons.
8. Sundarram, A. and T.P.K. Murthy, *α -amylase production and applications: a review*. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2014. **2**(4): p. 166-175.
9. Olsovská, J., et al., *Humulus lupulus L.(Hops)—a valuable source of compounds with bioactive effects for future therapies*. Mil. Med. Sci. Lett.(Voj. Zdrav. Listy), 2016. **85**(1): p. 19-30.
10. Karabín, M., et al., *Biologically active compounds from hops and prospects for their use*. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2016. **15**(3): p. 542-567.
11. Fink, W., *A preliminary investigation of the chemistry of hops: Methods for extraction and alpha-acid isomerization kinetics*. 2017.
12. Verstrepen, K.J., et al., *Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?* Trends in biotechnology, 2004. **22**(10): p. 531-537.
13. Capece, A., et al., *Conventional and non-conventional yeasts in beer production*. Fermentation, 2018. **4**(2): p. 38.
14. Verstrepen, K., et al., *Yeast flocculation: what brewers should know*. Applied microbiology and biotechnology, 2003. **61**(3): p. 197-205.
15. *Principais etapas do processo de fabrico de cerveja*. 05/11/2018; Available from: <http://www.cervejasdomundo.com/barley.gif>.
16. Lopes da Silva, J.A., *Biotecnologia Alimentar Avançada*. 2018.
17. Tomasi, I., et al., *Validation of a high-performance size-exclusion chromatography method to determine and characterize β -glucans in beer wort using a triple-detector array*. Food chemistry, 2017. **214**: p. 176-182.
18. Willaert, R., *The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer*. Handbook of Food Products Manufacturing, 2 Volume Set, 2007: p. 443.

19. He, Y., et al., *Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer—a review*. Journal of the Institute of Brewing, 2014. **120**(3): p. 157-163.
20. MacWilliam, I., *Wort composition—A review*. Journal of the Institute of Brewing, 1968. **74**(1): p. 38-54.
21. Spevacek, A.R., et al., *Beer metabolomics: molecular details of the brewing process and the differential effects of late and dry hopping on yeast purine metabolism*. Journal of the Institute of Brewing, 2016. **122**(1): p. 21-28.
22. Hardwick, W., *Handbook of brewing*. 1994: CRC Press.
23. White, C. and J. Zainasheff, *Yeast: the practical guide to beer fermentation*. 2010: Brewers Publications.
24. Liu, C., et al., *Simultaneous determination of diethylacetal and acetaldehyde during beer fermentation and storage process*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. **98**.
25. Lodolo, E.J., et al., *The yeast Saccharomyces cerevisiae— the main character in beer brewing*. FEMS Yeast Research, 2008. **8**(7): p. 1018-1036.
26. Li, X., A. Duerkop, and O.S. Wolfbeis, *A Fluorescent Probe for Diacetyl Detection*. Journal of Fluorescence, 2009. **19**(4): p. 601-606.
27. Goldammer, T., *The brewers' handbook*. 1999: KVP Publishers Clifton, Virginia.
28. Venturini Filho, W.G., *Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia*. Vol. 1. 2018: Editora blucher.
29. Eksiri, M., L. Nateghi, and A. Haghverdi, *Use of pasteurization unit for estimation of microbial quality of Iranian non-alcoholic beer using different thermal treatments and various types of packaging*. International Journal of Biosciences (IJB), 2014. **5**(9): p. 316-320.
30. *BeerSmith™ Home Brewing Software*. 30/12/2018; Available from: <http://beersmith.com/>.
31. Lodolo, E.J., et al., *The yeast Saccharomyces cerevisiae—the main character in beer brewing*. FEMS yeast research, 2008. **8**(7): p. 1018-1036.
32. *Câmara de contagem de Neubauer*. 07/12/2019; Available from: https://www.google.com/search?q=camara+de+contagem+de+neubauer&rlz=1C1CHBD_pt-PTPT862PT862&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=2ahUKewia_NiTgrXmAhWHHRQKHAbAo8Q_AUoAXoECAwQAw&biw=1366&bih=657#imgrc=FCE3hJFg26hobM:
33. Kwolek-Mirek, M. and R. Zadrag-Tecza, *Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells*. FEMS yeast research, 2014. **14**(7): p. 1068-1079.
34. Peperzak, L. and C.P. Brussaard, *Flow cytometric applicability of fluorescent vitality probes on phytoplankton*. Journal of phycology, 2011. **47**(3): p. 692-702.
35. *Ciclo de vida de um produto*. 05/10/2019; Available from: <https://usemobile.com.br/wp-content/uploads/2019/02/Ciclo-de-vida-img-1-1024x467.png>.
36. Mintel. *Global Food & Drink Trends 2018*. 17/06/2019; Available from: https://gastronomiaycia.republica.com/wp-content/uploads/2017/10/informe_mintel_tendencias_2018.pdf.
37. Vegetariano, C. *Estudo da AC Nielsen, para o Centro Vegetariano, para determinar o número de pessoas com alimentação vegan e vegetariana em Portugal*. 2017; Available from:

<https://www.centrovegetariano.org/Article-620-Numero-vegetarianos-quadruplica-10-anos-Portugal.html>.

38. Bogue, J., C. Seymour, and D. Sorenson, *Market-oriented new product development of meal replacement and meal complement beverages*. Journal of Food Products Marketing, 2006. **12**(3): p. 1-18.
39. Oliveira-Brochado, A., P.Q. Brito, and F. Oliveira-Brochado, *Correlates of adults' participation in sport and frequency of sport*. Science & Sports, 2017. **32**(6): p. 355-363.
40. PORDATA. *Praticantes desportivos federados por mil habitantes*. 09/11/2018; Available from: <https://www.pordata.pt/DB/Portugal/Ambiente+de+Consulta/Tabela>.
41. Brányik, T., et al., *A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production*. Journal of Food Engineering, 2012. **108**(4): p. 493-506.
42. Schneider, M.B. and H.J. Benjamin, *Sports drinks and energy drinks for children and adolescents: are they appropriate?* Pediatrics, 2011. **127**(6): p. 1182-1189.
43. Branco¹, L., et al., *Bebidas Energéticas: Qual a Realidade na Adolescência?* 2017.
44. Baranauskas, M., et al., *Nutritional habits among high-performance endurance athletes*. Medicina, 2015. **51**(6): p. 351-362.
45. Jeukendrup, A.E., *Carbohydrate intake during exercise and performance*. Nutrition, 2004. **20**(7-8): p. 669-77.
46. Brouns, F. and E. Kovacs, *Functional drinks for athletes*. Trends in Food Science & Technology, 1997. **8**(12): p. 414-421.
47. Rowlands, D., *The Optimum Composition for Endurance Sports Drinks*. Sportsmedicine, 2006. **10**: p. 59-63.
48. da Matta, V.M., D. Wolkoff, and R. Moretti, *Bebidas para praticantes de atividades físicas: repositores hidroeletrólitos*. Embrapa Agroindústria de Alimentos-Documents (INFOTECA-E), 2009.
49. Ferreira, C., J.A.d. Santos, and T. Amaral, *Contribuição da composição nutricional e energética das bebidas para a hidratação na actividade física*. 2010.
50. Lima, S.M.d.C., *o impacto da ingestão de água, bebida desportiva e bebida desportiva com cafeína na performance física, técnica e cognitiva após um jogo simulado de hóquei em patins: Trabalho de Investigação: The impact of water, sports drink and sports drink with caffeine intake on physic, skill and cognitive performance before a roller hockey game*. 2010.
51. Kreider, R.B., et al., *ISSN exercise & sport nutrition review: research & recommendations*. Journal of the International Society of Sports Nutrition, 2010. **7**(1): p. 7.
52. Grandjean, A., y Ruud, *JS Nutrión para Deportistas*. Van Way III, CW Secretos de la Nutrition, Editorial McGraw-Hill Interamericana, México, 1999. **79**: p. 83.
53. Aoi, W., Y. Naito, and T. Yoshikawa, *Exercise and functional foods*. Nutr J, 2006. **5**: p. 15.
54. Blanco, C.A., C. Andrés-Iglesias, and O. Montero, *Low-alcohol beers: Flavor compounds, defects, and improvement strategies*. Critical reviews in food science and nutrition, 2016. **56**(8): p. 1379-1388.

55. FAO. *Codex Alimentarius*. 09/11/2018; Available from: <http://www.fao.org/gsfaonline/foods/details.html?id=250>.
56. PORDATA. *Praticantes desportivos federados: total e por escalão etário*. 09/11/2018; Available from: <https://www.pordata.pt/Portugal/Praticantes+desportivos+federados+total+e+por+escal%C3%A3o+et%C3%A1rio-2228-178706>
57. PORDATA. *Praticantes desportivos federados: total e por sexo*. 09/11/2018; Available from: <https://www.pordata.pt/Portugal/Praticantes+desportivos+federados+total+e+por+sexo-2229>.
58. Lawless, H.T. and H. Heymann, *Sensory evaluation of food: principles and practices*. 2010: Springer Science & Business Media.
59. Welz, B. and M. Sperling, *Atomic absorption spectrometry*. 2008: John Wiley & Sons.
60. Meyer, V.R., *Practical high-performance liquid chromatography*. 2013: John Wiley & Sons.
61. ISO. *ISO 16649-2:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli*. 29/09/2019; First edition:[Available from: através de <https://www.sis.se/api/document/preview/617603/>].
62. ISO. *ISO 6888-2:1999 - Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species)*. 29/09/2019; First edition: Available from: <https://www.sis.se/api/document/preview/615554/>.

Anexo – Questionário aplicado ao público-alvo

Bebida para praticantes de desporto

O questionário que se segue tem como objetivo a realização de um projeto no âmbito de uma tese do mestrado em Biotecnologia Alimentar, na Universidade de Aveiro, e nele irá encontrar um conjunto de questões que nos ajudarão a avaliar o seu interesse em consumir uma bebida adequada para praticantes de desporto. O seu preenchimento demorará apenas alguns minutos. Todas as respostas são anónimas e confidenciais e a sua participação é voluntária, podendo recusar-se a participar ou retirar-se a qualquer momento. Contudo, a sua resposta poderá contribuir para que um novo produto do seu agrado seja lançado no mercado. Desde já, muito obrigada pela sua colaboração!

Grupo I

1. Qual o seu género?

- Feminino
- Masculino
- Outro

2. Qual a sua idade?

- Menos de 18
- Entre 18 e 24
- Entre 25 e 39
- Entre 40 e 64
- Mais de 64

3. Qual o distrito em que reside?

- Aveiro
- Beja
- Braga
- Bragança
- Castelo Branco
- Coimbra
- Évora
- Faro
- Guarda
- Leiria
- Lisboa
- Portalegre

- Porto
- Santarém
- Setúbal
- Viana do Castelo
- Vila Real
- Viseu
- Madeira
- Açores

4. Qual a sua situação profissional na atualidade?

- Estudante
- Trabalhador não qualificado
- Militar do exército, forças armadas ou marinha
- Representante do poder legislativo e de órgãos executivos, dirigente, diretor ou gestor executivo
- Especialista em atividades intelectuais e científicas
- Técnico ou profissional de nível intermédio
- Trabalhador dos serviços pessoais, de proteção e segurança ou vendedor
- Agricultor ou trabalhador qualificado da agricultura, da pesca e da floresta
- Trabalhador qualificado na indústria, construções e artífices
- Operador de instalações e máquinas ou trabalhador de montagem
- Investigador
- Desempregado
- Reformado
- Outra opção ...

5. Se pratica algum tipo de atividade física desportiva com frequência, por favor selecione o(s) tipo(s) que pratica com maior frequência.

- Corrida (incluindo trail)
- Caminhada (incluindo montanhismo e pedestrianismo)
- Ciclismo (incluindo BTT)
- Natação
- Dança/Ballet
- Futebol/Futsal
- Basquetebol
- Voleibol
- Andebol
- Desportos de raquetes (ténis, badminton, squash, padel)
- Artes marciais (karaté, taekwondo, jiu-jitsu, aikido, capoeira)
- Desportos de luta (boxe, muay thai)
- Meditação (yoga, pilates)
- Hóquei em patins
- Equitação

- Musculação
- Crossfit
- Outra opção ...
- Não pratico nenhuma atividade física desportiva com frequência

Grupo II

Para as questões que se seguem, considere que se pretende introduzir no mercado uma nova bebida sem álcool que incorpora mosto de cerveja (um produto intermediário do processo de fabrico da cerveja) e que é adequada para quem pratica algum tipo de desporto de resistência com regularidade.

6. Com que frequência compra ou consome produtos alimentares específicos para desportistas?

- Diariamente
- Uma a quatro vezes por semana
- Uma a quatro vezes por mês
- Raramente
- Nunca

7. Já ingeriu alguma bebida produzida a partir de malte ou mosto de cerveja, que não cerveja?

- Sim, e gostei
- Sim, mas não gostei
- Não

(Apenas para quem respondeu “Sim, e gostei” à questão 8”)

7.1. Se já provou alguma bebida produzida a partir de malte/ mosto de cerveja, e gostou, o que mais valorizou nesse produto?

- Sabor doce
- Sabor amargo
- Sabor ácido
- Sabor a cereais
- Sensação de frescura
- Presença de gás
- Ausência de gás

(Apenas para quem respondeu “Sim, mas não gostei” à questão 8”)

7.2. Se já provou alguma bebida produzida a partir de malte/ mosto de cerveja, e não gostou, o que menos lhe agradou nesse produto?

- Sabor demasiado doce
- Sabor demasiado amargo
- Sabor demasiado ácido
- Sabor a cereais
- Reduzida sensação de frescura
- Presença/excesso de gás
- Ausência/escassez de gás

Grupo III

8. Da lista que se segue, selecione um máximo de 3 sabores que gostaria de experimentar numa bebida sem álcool e à base de mosto de cerveja.
- Romã e ginseng
 - Frutos silvestres e hortelã
 - Framboesa
 - Amora
 - Morango
 - Mirtilo
 - Maracujá
 - Laranja/Toranja
 - Outra opção ...
9. Se encontrasse à venda uma bebida sem álcool, à base de mosto de cerveja, identificada como adequada para praticantes de desporto, compraria?
- Sim
 - Não
 - Talvez
10. Quanto estaria disposto a pagar por uma unidade (33 cl) dessa bebida?
- Não compraria
 - Entre 1€ e 2€
 - Entre 2€ e 3€
 - Entre 3€ e 4€