

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – EEL/USP

IGOR DE OLIVEIRA CARDOSO

**Averiguação da utilização da folha de louro (*Laurus nobilis*) na produção de cerveja pilsen
puro malte**

LORENA – SP

2020

IGOR DE OLIVEIRA CARDOSO

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado na Escola de Engenharia de Lorena
EEL-USP como requisito obrigatório para a
conclusão do curso de Engenharia Bioquímica

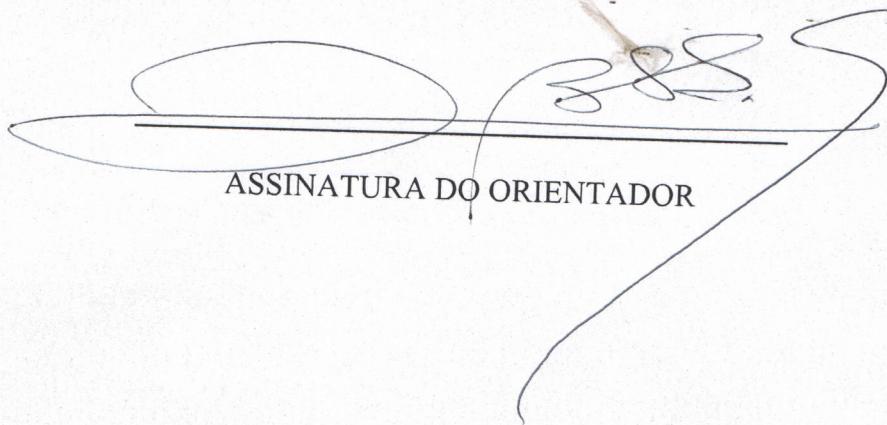
Orientador: Prof. Dr. João Batista de Almeida e
Silva

**Averiguação da utilização da folha de louro (*Laurus nobilis*) na produção de cerveja pilsen
puro malte**

LORENA – SP

2020

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DO TRABALHO DE
CONCLUSÃO DE CURSO DO ALUNO IGOR DE OLIVEIRA CARDOSO,
ORIENTADO PELO PROF. DR. JOÃO BATISTA DE ALMEIDA E SILVA.



ASSINATURA DO ORIENTADOR

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cardoso, Igor de Oliveira

Averiguação da utilização da folha de louro (*Laurus nobilis*) na produção de cerveja pilsen puro malte. / Igor de Oliveira Cardoso; orientador João Batista de Almeida e Silva. - Lorena, 2020.

33 p.

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Bioquímica - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Cerveja. 2. Pilsen. 3. Ale. 4. Folha de louro. 5. óleo essencial. I. Título. II. Silva, João Batista de Almeida e, orient.

Agradecimentos

Agradeço a todos os professores que participaram de todas as etapas da minha vida acadêmica, contribuindo para a formação do ser humano que sou hoje.

À República Del Ponte, que me acolheu desde o início dessa jornada. Local onde cresci em todos os sentidos e conheci irmãos que levarei para a vida inteira. Sempre lembrarei dos incríveis momentos que passamos juntos.

Aos meus pais, que me apoiaram em todos os momentos da minha vida e acreditaram nos meus sonhos.

Ao Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva, que despertou em mim o interesse pela tecnologia de bebidas e disponibilizou os recursos necessários para a elaboração dessa pesquisa.

Ao Júlio Soares Goes e Eduardo Brandão, que contribuíram muito com seus conhecimentos técnicos e experiências profissionais.

À Escola de Engenharia de Lorena, por possuir um excelente corpo docente e disponibilizar todos os recursos necessários para a minha formação como engenheiro bioquímico.

À todos que de certa forma participaram da minha vida.

“ A cerveja é a prova viva de que Deus nos ama e nos quer felizes.”
Benjamin Franklin

RESUMO

CARDOSO, I. O. **Avaliação da utilização da folha de louro (*Laurus nobilis*) na produção de cerveja pilsen puro malte.** 2020. Monografia (Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Bioquímica) – Universidade de São Paulo - EEL, Lorena, 2020.

A cerveja é a bebida alcoólica mais antiga produzida pela humanidade. Durante vários séculos de desenvolvimento, diversos estilos foram criados ao redor do mundo. Por tratar-se de uma bebida popular e barata, a cerveja é encontrada com extrema facilidade e apreciada em todos os países. A produção de bebidas no Brasil é regulamentada pela lei 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas tais como a cerveja. Mais precisamente, o artigo 64º define cerveja como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por adição de levedura, com adição de lúpulo. Uma porcentagem do malte de cevada pode ser substituído por outros cereais maltados ou não. Para que uma cerveja seja considerada alcoólica, deve apresentar uma quantidade igual ou superior a 0,5% em volume. A adição de adjuntos em algumas etapas na produção de cervejas é bem comum, incluindo a utilização de frutas e ervas. Neste trabalho produziu-se uma cerveja com malte pilsen e folha de louro, onde adicionou-se o adjunto nas etapas de fervura, fermentação e maturação. O objetivo foi avaliar a qualidade sensorial oriunda das folhas de louro. A escolha da folha de louro (*Laurus nobilis*) deve-se a suas propriedades aromáticas e medicinais provenientes do óleo essencial das folhas. Os experimentos foram realizados em duplicata para maior confiabilidade dos dados coletados. A mosturação desenvolveu-se no estilo de cerveja pilsen, pois apresenta maior leveza e neutralidade de aromas em relação aos demais estilos. A fermentação foi realizada por leveduras do tipo Ale da marca Safale® US-05, por um período de 88 horas com temperatura controlada de 18°C. A maturação dos experimentos foi realizado na câmara fria a 5°C por um período de 14 dias. Ao final dos experimentos, foi averiguado o impacto das folhas de louro em relação aos parâmetros cinéticos.

Palavras-chave: cerveja, pilsen, ale, folha de louro e óleo essencial.

ABSTRACT

CARDOSO, I. O. **Avaliação da utilização da folha de louro (*Laurus nobilis*) na produção de cerveja pilsen puro malte.** 2020. Monografia (Trabalho de conclusão do curso de Engenharia Bioquímica) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Beer is the oldest alcoholic beverage produced by mankind. During several centuries of development, different styles have been created around the world. Because it is a popular and cheap drink, beer is easily found and appreciated in all countries. The production of beverages in Brazil is regulated by law 8,918, of July 14, 1994, which provides for the standardization, classification, registration, inspection, production and inspection of beverages such as beer. More precisely, Article 64 defines beer as the drink obtained by the alcoholic fermentation of the brewing must from barley malt and drinking water, by adding yeast, with the addition of hops. A percentage of barley malt can be substituted for other malted cereals or not. For a beer to be considered alcoholic, it must have an amount equal to or greater than 0.5% by volume. The addition of adjuncts in some stages in the production of beers is quite common, including the use of fruits and herbs. In this work a beer was produced with pilsen malt and bay leaf, where the adjunct was added in the stages of boiling, fermentation and maturation. The objective was to evaluate the sensory quality from the bay leaves. The choice of the bay leaf (*Laurus nobilis*) is due to its aromatic and medicinal properties derived from the essential oil of the leaves. The experiments were carried out in duplicate for greater reliability of the collected data. The mash was developed in the style of lager, because it presents greater lightness and neutrality of aromas in relation to the other styles. Fermentation was carried out by Safale® US-05 Ale yeasts, for a period of 88 hours with a controlled temperature of 18°C. The experiments were matured in a cold chamber at 5°C for a period of 14 days. At the end of the experiments, the impact of the bay leaves in relation to the kinetic parameters was verified.

Keywords: beer, pilsen, ale, bay leaf and essential oil.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema do processo de produção de cerveja.....	14
Figura 2 - Técnica de dry hopping.....	15
Figura 3 - Complexação do iodo com a estrutura do amido.....	15
Figura 4 - Solução de iodeto de potássio com amostra não convertida.....	16
Figura 5 - Solução de iodeto de potássio com amostra convertida.	16
Figura 6 - Rampa de brassagem.	17
Figura 7 - Leveduras Safale US-05	17
Figura 8 - Lúpulo Azacca	20
Figura 9 - Biorreatores de 4,5 L e esquema de amostragem.	22
Figura 10 - Concentração celular dos experimentos 1 e 2 (Branco).	23
Figura 11 - Concentração celular dos experimentos 3 e 4 (Fermentação).	24
Figura 12 - Concentração celular dos experimentos 5 e 6 (Fervura).....	24
Figura 13 - Concentração celular dos experimentos 7 e 8 (Maturação).....	25
Figura 14 - Linearização na fase exponencial de crescimento.	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade biológica de <i>Laurus nobilis</i>	14
Tabela 2 - Planejamento dos experimentos.	16
Tabela 3 - Concentração celular (g/L).....	23
Tabela 4 - Consumo de substrato e teor alcoólico estimado.	25
Tabela 5 - Parâmetros do processo fermentativo.....	26
Tabela 6 - Velocidade específica máxima e linearização.....	27

SUMÁRIO

1	Introdução	11
1.1	Contextualização.....	11
1.2	Cerveja Pilsen	11
1.3	Folha de Louro	12
2	Objetivos.....	12
2.1	Objetivos específicos	12
3	Revisão Bibliográfica.....	13
3.1	Panorama da Cerveja no Brasil.....	13
3.2	Cervejarias Artesanais	13
3.3	Processo de Produção	13
3.4	Folha de Louro.....	14
3.5	Dry Hopping	15
4	Metodologia.....	15
4.1	Materiais para a produção da cerveja pilsen puro malte.....	19
4.1.1	Água.....	19
4.1.2	Malte de cevada	20
4.1.3	Folhas de Louro	20
4.1.4	Lúpulo.....	20
4.2	Obtenção do mosto	20
4.2.1	Moagem dos grãos de cevada.....	20
4.2.2	Mosturação	21

4.2.3	Fervura.....	21
4.2.4	Fermentação.....	21
4.2.5	Maturação	22
5	Resultados e Discussões.....	22
6	Conclusão	28
7	Referências bibliográficas.....	29

1 Introdução

1.1 Contextualização

A cerveja e sua produção estão intimamente ligadas ao desenvolvimento da humanidade. As primeiras sociedades possuíam grande parte de sua população nas zonas rurais, onde a produção e consumo de cervejas eram uma atividade comercial e complemento na dieta em algumas regiões do planeta. Com o aumento da popularidade das cervejas ao redor do mundo, diversos estilos e variações surgiram com o tempo e, atualmente, uma gama enorme de produtos estão disponíveis no mercado para atender diversos públicos. O crescimento vertiginoso das cervejas artesanais ajudam a aquecer a economia e a disseminar o conhecimento sobre esse produto.

Por meio de estudos arqueológicos, descobriu-se registros rupestres e símbolos primitivos de uma bebida de cereais fermentada semelhante à cerveja em 6000 a.C.. O pesquisador Bedrich Hrozny, especialista em idiomas antigos, decifrou algumas inscrições que comprovam o papel de uma bebida fermentada como moeda de troca na região da Mesopotâmia. Outras pesquisas sugerem uma ligação entre a cerveja e o código de Hamurabi, onde consta uma possível pena de morte para o cervejeiro que viesse a adulterar de alguma forma o produto. Nessas sociedades, a cerveja também era utilizada como remédio, oferenda aos deuses e até mesmo como salário (MORADO, 2011).

No Brasil, a legislação sobre produção de bebidas alcoólicas, lei 8.918, artigo 64º, de 14 de julho de 1994, define que cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e/ou outros cereais maltados ou não.

1.2 Cerveja Pilsen

Na cidade de Plzeň, atual República Checa, no ano de 1840, inicia-se a história da cerveja pilsen. Após a Segunda Revolução Industrial, os avanços da microbiologia e do setor elétrico permitiram que a população refrigerasse seus alimentos e processos industriais. Isso possibilitou o surgimento da Mestansky Pivovar Plzeň em 1839, a primeira cervejaria pilsen e governamental da história (Prazdroj, 2019).

As cervejas pilsen apresentam leveza, sensação refrescante, baixo teor alcoólico, cor dourada, espuma cremosa e baixo amargor. Algumas referências técnicas para a definição de cervejas Pilsen são: (i) extrato inicial 10,87°P – 13,06°P; (ii) extrato residual 1,75°P – 3,60°P; (iii)

grau de atenuação 56 – 70,2%; (iv) 2,5 – 5% (v/v) de álcool; (v) amargor 3,1 – 51,2 IBU (BRIGGS, 2004).

O estilo pilsen é o mais consumido no mercado brasileiro. A combinação do clima tropical quente e úmido com os atributos de leveza e potabilidade desse estilo, favorecem o consumo predominante da cerveja pilsen. Com o advento das cervejarias artesanais, também veio uma grande variedade de estilos, que até então eram desconhecidos por muitos consumidores brasileiros.

1.3 Folha de Louro

A família Lauraceae é representada por 50 gêneros contendo aproximadamente 2500 espécies, em geral de porte arbóreo ou arbustivo, amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, especialmente no sudeste asiático e na América do Sul (JUDD et al., 1999). Dentre as espécies aromáticas, destaca-se a *Laurus nobilis L.*, conhecida como folha de louro ou loureiro. Essa espécie é amplamente utilizada na culinária, perfumaria e medicina popular devido à presença de substâncias bioativas. A ingestão dessas substâncias são benéficas para a saúde humana, demonstrando propriedade carmitiva, antiespasmódica (SILVA, 1996), analagésica, antiinflamatória e antioxidante (SIMI et al., 2003).

As folhas do loureiro possuem aproximadamente 1,3% de óleo essencial em massa de folha seca, majoritariamente composto por eugenol, linalol, cineol, sabineno, limoneno, pineno, geraniol e canfeno (SKIDMORE-ROTH, 2004). Os benefícios dessa planta possibilitam sua utilização em tratamentos cardiopneumológicos, sendo acrescentado nas refeições hospitalares. Além de aumentar a aceitação alimentar dos pacientes, suas substâncias comprovaram efeitos hipoglicemiantes e dislipidêmicos (InCor, 2016).

2 Objetivos

Averiguar a utilização da folha de louro *Laurus nobilis L.* em diferentes etapas da produção de uma cerveja pilsen puro malte.

2.1 Objetivos específicos

Averiguar a influência da folha de louro sobre o crescimento celular das leveduras e produção de etanol no meio fermentativo. Averiguar a presença de aroma e sabor.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Panorama da Cerveja no Brasil

A Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CervBrasil) divulgou dados em 2016, onde o setor emprega direta e indiretamente 2,2 milhões de pessoas ao longo de sua cadeia produtiva. O setor cervejeiro mostra-se ainda mais importante ao ser responsável por 1,6% do PIB nacional, registrando um faturamento de 77 bilhões de reais por ano. Cerca de 75% da produção concentra-se nas regiões sudeste e nordeste, totalizando 50 fábricas em todo o território nacional.

A parcela da população que mais contribui para o mercado cervejeiro no Brasil é composto principalmente por jovens, do sexo masculino e que possuem pouco poder aquisitivo. As classes sociais denominadas C, D e E representam aproximadamente 70% do consumo total. Atualmente, as pessoas do sexo feminino ganham cada vez mais espaço no mercado consumidor, correspondendo por cerca de 33% do consumo brasileiro de cervejas (ROSA, 2006).

3.2 Cervejarias Artesanais

Durante a década de 1990, o chamado renascimento cervejeiro ocorreu no Brasil. Esse acontecimento está diretamente ligado aos Estados Unidos e em partes da Europa, países estes que aumentaram a variedade de opções para o mercado consumidor. A elaboração de produtos mais refinados também altera a percepção que as pessoas tem sobre a cerveja. Observa-se o aumento crescente de microcervejarias que estão dispostas a oferecer uma experiência diferenciada para o consumidor (GIORGI, 2015).

Produtores, consumidores e outras pessoas ligadas à cadeia produtiva de cervejas artesanais estão disseminando a chamada cultura cervejeira, cujo o principal objetivo é estabelecer um novo conceito de cerveja no território nacional. A celebração e valorização desse tipo de produto traz diversos aspectos históricos, culturais e organolépticos associados a uma diferenciação entre o produto artesanal e o produto industrializado (BELTRAMELLI, 2012).

3.3 Processo de Produção

Um processo básico de produção de cerveja envolve as seguintes etapas: moagem, mosturação, filtração, fervura, fermentação, maturação e envase. A Figura 1 apresenta um esquema básico do processo de produção de cerveja.

Figura 1 - Esquema do processo de produção de cerveja.



Fonte: Adaptado (LINKO, 1998).

3.4 Folha de Louro

Atualmente, o loureiro tornou-se protagonista em diversas pesquisas que tem como objetivo descobrir possíveis aplicações para seus metabólitos secundários. Tais metabólitos estão intimamente relacionados a benefícios referentes à saúde humana com diversas atividades biológicas. Perante o grande número de propriedades das folhas de louro, esse vegetal demonstrou-se um candidato promissor para a realização dessa pesquisa e sua utilização na indústria cervejeira. Uso justificado principalmente pelas propriedades medicinais, antifúngicas e antibacterianas. Algumas das funções fisiológicas estão relacionadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Atividade biológica de *Laurus nobilis*.

Atividade biológica	Referências
Anticonvulsiva	Sayyah, Valizadeh e Kamalinejad, 2002.
Analgésica e anti-inflamatória	Sayyah et al
Inibição da produção de óxido nítrico	De Marino et al., 2004.
Inibição da acetilcolinesterase	Ferreira et al., 2006.
Ação anti-inflamatória e antitumoral	Kaileh et al., 2007.
Ação antifúngica e antibacteriana	Marzouki et al., 2009b.
Inibição da proliferação celular	Kim et al., 2011.
Ação inseticida	Jemâa et al., 2012.
Ação antioxidante e antibacteriana	Ramos et al., 2012
Ação antitumoral e antioxidante	Saab et al., 2012.

Fonte: Adaptado (PEREIRA, 2004).

3.5 Dry Hopping

A técnica de dry hopping trata-se da adição de lúpulo em determinadas etapas da produção de cervejas. Geralmente, emprega-se essa técnica nas etapas de mosturação, fervura e maturação. Para facilitar a remoção das partículas do lúpulo, utiliza-se um saco de infusão feito de polipropileno de trama fina. A Figura 2 apresenta a técnica de dry hopping.

Figura 2 - Técnica de dry hopping



Fonte: www.pontodocervejeiro.com.br

4 Metodologia

Todos experimentos foram realizados na microcervejaria da Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo (EEL-USP). Realizaram-se todos os experimentos em duplicata para maior confiabilidade dos dados coletados. Utilizou-se uma solução de iodeto de potássio de concentração 0,2 N, com a finalidade de monitorar a conversão do amido em maltose fermentecível durante a mosturação.

Enquanto a solução de iodeto de potássio com mosto apresentar coloração azulada ou roxa a mosturação não terminou. A amilose e a amilopectina sofrem complexação com o iodo, resultando em uma coloração azul e avermelhada, respectivamente. A Figura 4 demonstra o início da mosturação quando ocorre a complexação do iodo com o amido. A Figura 5 ilustra que a reação de complexação não ocorre mais, indicando o final do processo de mosturação. A Figura 3 apresenta a complexação do iodo com a estrutura do amido a nível molecular.

Figura 3 - Complexação do iodo com a estrutura do amido.



Fonte: www.fcfar.unesp.br

Figura 4 - Solução de iodeto de potássio com amostra não convertida.



Fonte: O autor.

Figura 5 - Solução de iodeto de potássio com amostra convertida.



Fonte: O autor.

Para o planejamento dos experimentos, decidiu-se que as folhas de louro seriam adicionadas em diferentes etapas cruciais do processo de produção da cerveja (fervura, fermentação e maturação). A Tabela 2 mostra o planejamento dos experimentos realizados.

Tabela 2 - Planejamento dos experimentos.

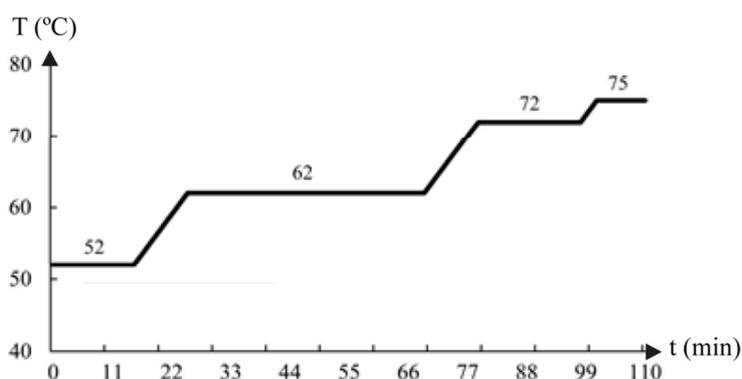
Nº Exp	Etapa com adição de folha de louro
1 e 2	Nenhuma (Branco)
3 e 4	Fermentação
5 e 6	Fervura
7 e 8	Maturação

Fonte: O autor.

Todos os experimentos foram realizados em reatores com 4,5L de volume útil. Para os experimentos 1, 2, 3 e 4 produziram-se 18L de mosto, sendo divididos igualmente em seus

respectivos reatores. Adicinaram-se folhas de louro nos experimentos 3 e 4 após o terceiro dia de fermentação. Para os experimentos 5, 6, 7 e 8 o volume de 18L mosto foi dividido igualmente antes da etapa de fervura. Durante o processo de fervura dos experimentos 5 e 6 adicionaram-se folhas de louro, substituindo o lúpulo na proporção de 95%. Na etapa de maturação dos experimentos 7 e 8 adicionaram-se folhas de louro com a técnica de *dry hopping* por 14 dias. A mosturação em todos os experimentos foram realizados com a mesma rampa de brassagem e pH inicial de 5,2, ilustrada na Figura 3.

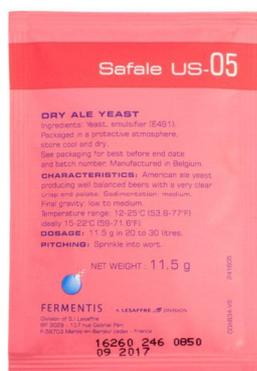
Figura 6 - Rampa de brassagem.



Fonte: O autor.

Para a fermentação, utilizaram-se leveduras padronizadas da marca Fermentis® Safale Ale US-05 que apresentam neutralidade de aroma e paladar. O fabricante informa que a concentração de 1 g de células por litro corresponde a 6 bilhões de células por litro. Com ácido láctico a 0,2 N, ajustou-se o pH para 4,7 antes da fermentação em todos os experimentos para otimizar a atuação das leveduras e evitar contaminação por fungos. A Figura 7 apresenta a levedura utilizada em todos os experimentos.

Figura 7 - Leveduras Safale US-05



Fonte: www.fermentis.com

Os biorreatores foram acomodados em um refrigerador e a temperatura controlada em 18 °C durante 88 horas. Realizou-se a amostragem em intervalos de aproximadamente 11 horas. O acompanhamento da fermentação foi feito por contagem celular na câmara de Neubaur e por determinação de substrato residual no meio. Para a determinação de substrato residual, utilizou-se uma centrífuga de bancada a 3000 rpm por 10 minutos. Retirou-se o sobrenadante e mediu-se aproximadamente 1000 mg na balança de umidade.

Para a mediação da concentração celular utilizou-se a câmara de Neubauer. Esse método consiste em contar o número de células em quadrantes específicos da câmara e tirar uma média. A média é utilizada na fórmula (1) para determinar a concentração celular em $n^{\circ}_{\text{células}} / \text{ml}$.

$$n^{\circ} \frac{\text{células}}{\text{ml}} = \mathbf{M. 25. 10000. f} \quad (1)$$

Em que:

- **M** = média da contagem celular nos 5 quadrantes.
- **f** = fator de diluição utilizado.

A densidade final ou *final gravity* (FG) foi determinada através de um densímetro digital portátil DMA 53 Basic da marca Anton Paar. A American Society of Brewing Chemists (ASBC) recomenda a utilização da fórmula (2) para determinação da densidade inicial ou standard gravity (SG) a partir da concentração de substrato coletados em °P.

$$\mathbf{SG = 1 + 3,859118. 10^{-3}. ^{\circ}Pi + 1,370735. 10^{-5}. ^{\circ}Pi^2 + 3,742517. 10^{-8}. ^{\circ}Pi^3} \quad (2)$$

Para a determinação o teor alcoólico do produto final as fórmulas (3) e (4) foram utilizadas. Tais fórmulas calculam uma estimativa da quantidade de álcool em ABW (Alcohol by Weight) e ABV (Alcohol by Volume). Utilizou-se a medida em ABV para calcular as demais variáveis do processo, visto que o volume de meio foi acompanhado ao longo de todas as etapas.

$$\mathbf{ABW(\%) = (0,372 + 0,00357. ^{\circ}Pi). (^{\circ}Pi - ^{\circ}Pf)} \quad (3)$$

$$\mathbf{ABV (\%) = ABW. \frac{1,308.10^{-5} + 3,868.10^{-3}. ^{\circ}Pi + 1,275.10^{-5}. ^{\circ}Pi + 6,3.10^{-8}. ^{\circ}Pi + 1}{0,7907}} \quad (4)$$

Em que:

- **°Pi** = grau Plato inicial ($\text{kg}_{\text{extrato}}/\text{hL}$)
- **°Pf** = grau Plato final ($\text{kg}_{\text{extrato}}/\text{hL}$)

O fabricante Fermentis® informa que a fase exponencial de crescimento das leveduras Safale US-05 pode durar até 40 horas de fermentação. Portanto, levou-se em consideração que a

fase exponencial de crescimento celular ocorreu no período entre 20 e 38 horas para os experimentos 1, 2, 3 e 4 e, para os experimentos 5, 6, 7 e 8, ocorreu no período entre 15 e 38 horas de fermentação. Ao integrar a fórmula (5) de velocidade específica de crescimento μ_x , pode-se calcular a velocidade específica de crescimento máximo $\mu_{\text{máx}}$ durante a fase exponencial de cada experimento fazendo a linearização representada pela fórmula (6).

$$\mu_x = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \quad (5)$$

$$\ln\left(\frac{x}{x_0}\right) = \mu_{\text{máx}} \cdot t \quad (6)$$

O parâmetro cinético de fermentação $Y_{P/S}$ foi calculado através da fórmula (7), uma vez que a quantidade de álcool produzido nos experimentos é conhecido. $Y_{X/S}$ e $Y_{P/X}$ foram calculadas

$$Y_{P/S} = \Delta P / \Delta S \quad (7)$$

Calculou-se o parâmetro cinético $Y_{X/S}$ através da estequiometria da equação de fermentação alcoólica a partir da glicose. Visto que uma fermentação alcoólica produz etanol e gás carbônico, o restante de substrato consumido é utilizado para manutenção celular e produção de novas células. A fórmula 8 apresenta a massa em g de células geradas a partir de 1 g de substrato consumido.

$$Y_{X/S} = \Delta X / \Delta S \quad (8)$$

A fórmula 9 apresenta o cálculo realizado para obter-se a eficiência do processo ($\mathcal{E}\%$), que é a razão entre o $Y_{P/S}$ experimental e o $Y_{P/S}$ teórico. Através da equação estequiométrica da fermentação alcoólica da glicose, sabe-se que o $Y_{P/S}$ é 0,5111.

$$\mathcal{E}(\%) = Y_{P/S \text{ exp.}} / Y_{P/S \text{ teo.}} \quad (9)$$

A produtividade foi calculada através da quantidade de álcool produzido pela quantidade total de horas transcorridas na fermentação.

4.1 Materiais para a produção da cerveja pilsen puro malte

Para os experimentos planejados foram utilizados como matéria-prima os seguintes componentes: água, malte de cevada, folhas de louro, lúpulo e leveduras.

4.1.1 Água

Utilizou-se a água para a obtenção do mosto, limpeza de todos os equipamentos e instrumentos.

4.1.2 Malte de cevada

O malte de cevada é de fundamental importância para o processo de produção de cervejas puro malte. Proporciona uma quantidade significativa de amido e enzimas naturais (α -amilase e β -amilase) provenientes da mosturação dos grãos de cevada. A mosturação, por sua vez, tornará acessível às leveduras a maltose dos grãos de cevada. Optou-se por não adicionar folhas de louro nessa etapa para não atrapalhar no processo de recirculação do mosto e formação da torta filtrante.

4.1.3 Folhas de Louro

As folhas de louro utilizadas foram da marca Kitano®, onde cada pacote contém 4 g do produto. As folhas possuem uma média de 1,3% em massa seca de óleo essencial. O rendimento da extração do óleo essencial utilizado nos cálculos foi de 26%, mesmo valor do lúpulo.

4.1.4 Lúpulo

O lúpulo utilizado foi o Azacca® da marca LNF, que possui 11,4% de α -ácidos. Sua escolha justifica-se pelo baixo impacto no aroma do produto final. De acordo com o fabricante, o rendimento de extração desse lúpulo é de 26%.

Figura 8 - Lúpulo Azacca



Fonte: www.lnf.com

4.2 Obtenção do mosto

4.2.1 Moagem dos grãos de cevada

A massa calculada de malte de cevada necessária foi de 4,114 kg, moído 2 vezes consecutivas em moinho de 2 rolos com abertura de 0,7 mm, disponível no laboratório da microcervejaria. É de fundamental importância que os grãos não sejam triturados, e sim moídos parcialmente para não fragmentar o malte e atrapalhar a brassagem. Os cálculos foram realizados com base em 70% de rendimento no extrato do malte demonstrados em pesquisas anteriores.

4.2.2 Mosturação

A brassagem dos grãos foi realizada com água, proveniente da fonte localizada na microcervejaria. Calculou-se para a água uma massa teórica de 12,342 kg para iniciar a mosturação dos experimentos. O tempo estimado para a hidrólise do amido, tornando os açúcares livres para consumo pelas leveduras, foi de 110 minutos. Realizaram-se testes em amostras periódicas utilizando iodeto de potássio a 0,2 N. Quando a reação não apresenta a coloração azulada ou roxa significa que essa etapa já pode ser finalizada. A mesma quantidade de água foi utilizada para a lavagem da torta filtrante, mas com temperatura de 75 °C e pH de 4,9. A concentração de substrato, em todos os experimentos, foi ajustada para 12 °P.

4.2.3 Fervura

Na etapa de fervura, optou-se por um teor de amargor 5 IBU para evitar interferências no aroma e paladar. Utilizou-se uma massa teórica de 3,036g do lúpulo. A fervura dos mostos para os experimentos 1, 2, 3 e 4 foi realizada na mesma panela cervejeira com 3,075 g de lúpulo, tendo em vista que estes só diferenciam-se na etapa de fermentação.

Nos experimentos 5 e 6, substituiu-se parcialmente o lúpulo por folhas de louro na razão de 95% folhas de louro e 5% de lúpulo para obter 5 IBU ao final dessa etapa. Portanto, as massas adicionadas nos experimentos 5 e 6 foram de 81,2 mg de lúpulo e 12,691 g de folhas de louro. Nos experimentos 7 e 8, utilizaram-se 1,563g de lúpulo para obter 5 IBU no mosto.

4.2.4 Fermentação

Após a fervura, realizaram-se várias vezes a recirculação do meio para que a torta filtrante fosse formada, resultando um mosto filtrado límpido. Deve-se esperar até que o meio apresente temperatura de 25°C para inoculação das leveduras no biorreator. O tempo sugerido pelo fabricante para a etapa de fermentação é de 5 dias, porém a fermentação cessou em 88h. O inóculo do tipo Ale exigiu que a temperatura ao longo desse período fosse controlada constantemente a 18°C. O final da fermentação foi definido pelo decaimento da concentração celular e constância do extrato residual no meio.

Acompanhou-se o crescimento microbiano pelo método de contagem celular em câmara de Neubauer. Posteriormente, os valores foram convertidos em ($\text{g}_{\text{célula}}/\text{L}_{\text{meio}}$) para avaliar o impacto das folhas de louro sobre as leveduras. Com o auxílio de uma balança de umidade, a quantidade de açúcares residuais em graus Plato (°P) foi determinada. Adicionaram-se nos experimentos 3 e 4 as quantidades de 6,671g e 6,694g de folhas de louro, respectivamente.

Empregou-se a técnica de *dry hopping* para facilitar a retirada das folhas de louro ao final da etapa de fermentação.

4.2.5 Maturação

Após o término da fermentação, os biorreatores foram colocados na câmara fria a 5 °C por 2 dias para decantar as células em suspensão. Após esse período, separou-se para outro biorreator idêntico a fase líquida. Os biorreatores foram recolocados na câmara fria a 5 °C por um período de 14 dias. Nos experimentos 7 e 8 adicionaram-se as quantidades de 6,701 g e 6,673 g de folhas de louro, respectivamente.

5 Resultados e Discussão

A Figura 4 demonstra os biorreatores de 4,5 L e o esquema de amostragem utilizado.

Figura 9 - Biorreatores de 4,5 L e esquema de amostragem.



Fonte: O autor.

A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos das concentrações celulares (X) ao longo da fermentação. Os valores de X foram convertidos para g/L através das informações fornecidas pelo fabricante das leveduras Safale US-05. Nos experimentos 3 e 4, as folhas de louro foram adicionadas com 38 horas de fermentação.

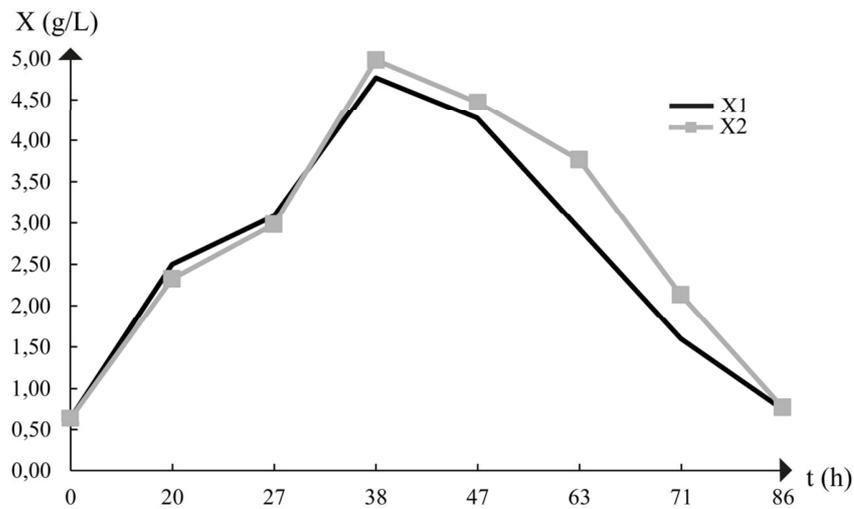
Tabela 3 - Concentração celular (g/L).

Etapa	t (h)	0	20	27	38	47	63	71	86
Branco	X ₁ (g/L)	0,64	2,50	3,08	4,77	4,27	2,93	1,60	0,75
	X ₂ (g/L)	0,64	2,33	2,98	4,98	4,47	3,77	2,13	0,78
Fermentação	X ₃ (g/L)	0,64	2,32	2,78	4,60	3,83	3,20	1,67	0,65
	X ₄ (g/L)	0,64	2,49	2,79	4,22	3,57	2,33	2,20	0,85
	t (h)	0	15	23	38	46	61	70	88
Fervura	X ₅ (g/L)	0,64	1,93	2,87	4,18	3,60	2,35	1,37	0,65
	X ₆ (g/L)	0,64	2,13	2,63	3,87	3,90	2,60	1,68	0,66
Maturação	X ₇ (g/L)	0,64	2,24	3,83	4,33	4,03	2,64	1,29	1,00
	X ₈ (g/L)	0,64	2,05	3,97	4,53	3,57	2,80	1,49	0,83

Fonte: O autor.

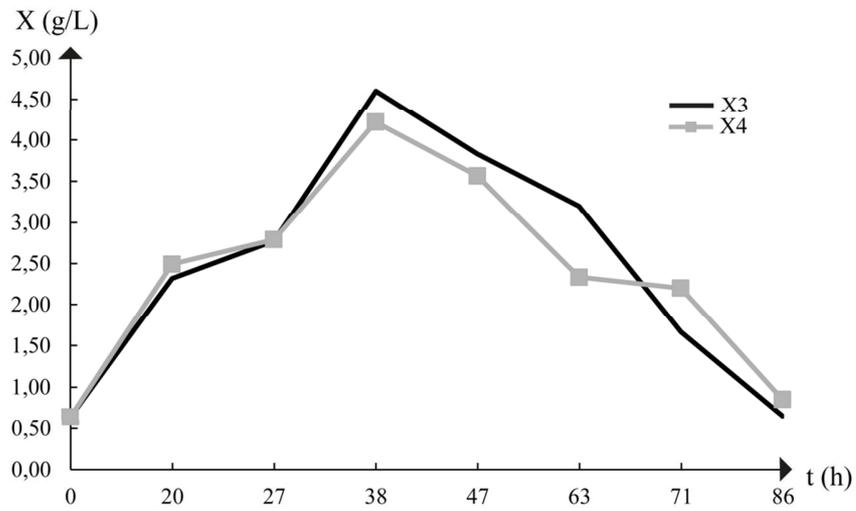
Os gráficos das Figuras 10, 11, 12 e 13 apresentam as concentrações celulares dos experimentos. Agrupou-se os experimentos de acordo com a etapa em questão.

Figura 10 - Concentração celular dos experimentos 1 e 2 (Branco).



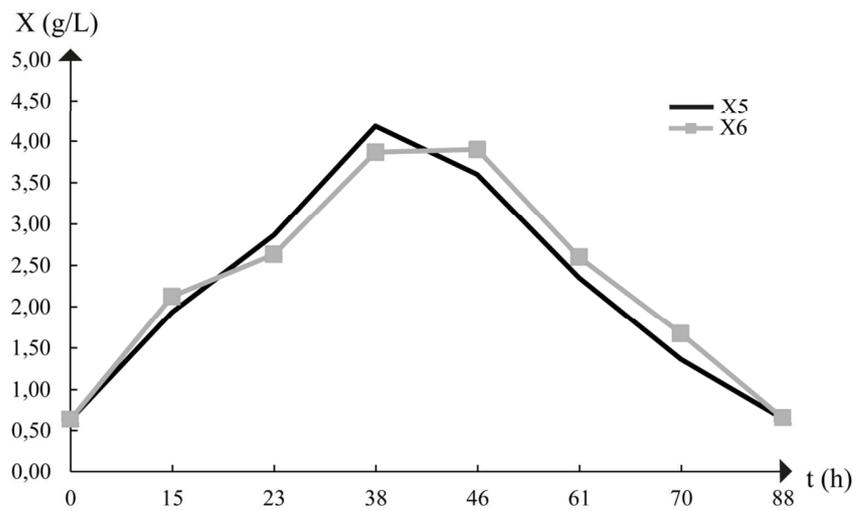
Fonte: O autor.

Figura 11 - Concentração celular dos experimentos 3 e 4 (Fermentação).



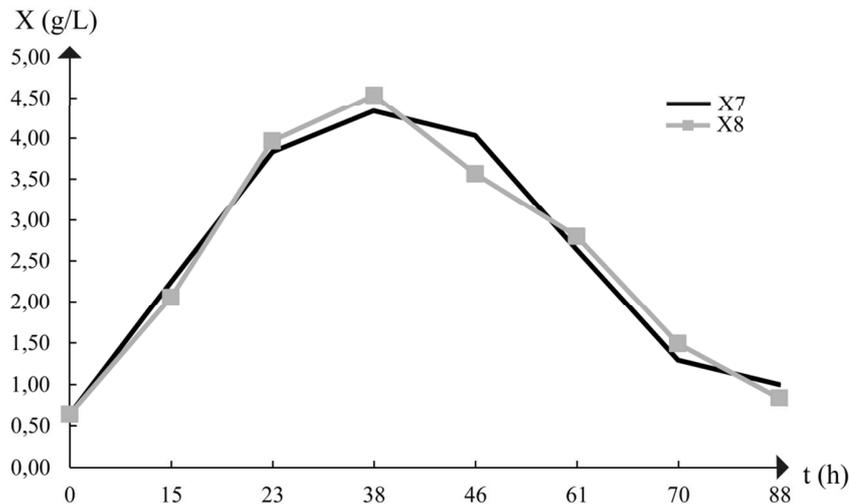
Fonte: O autor.

Figura 12 - Concentração celular dos experimentos 5 e 6 (Fervura).



Fonte: O autor.

Figura 13 - Concentração celular dos experimentos 7 e 8 (Maturação).



Fonte: O autor.

A atenuação representa o percentual de substrato consumido ao longo da fermentação. Através das densidades específicas e do consumo substrato, pode-se calcular o teor alcoólico no produto final. A Tabela 4 apresenta os resultados obtidos ao final da fermentação.

Tabela 4 - Consumo de substrato e teor alcoólico estimado.

Etapa	Exp	$^{\circ}\text{P}_{\text{Inicial}}$	$^{\circ}\text{P}_{\text{Final}}$	Atenuação (%)	SG (21°C)	FG (21°C)	ABV (%)
Branco	1	12,21 °P	3,74 °P	69,37	1,0493	1,0060	4,52
	2	12,21 °P	3,78 °P	69,04	1,0493	1,0046	4,50
Fermentação	3	12,21 °P	3,99 °P	67,32	1,0493	1,0057	4,39
	4	12,21 °P	4,02 °P	67,08	1,0493	1,0056	4,37
Fervura	5	12,14 °P	3,63 °P	70,10	1,0490	1,0058	4,53
	6	12,14 °P	3,49 °P	71,25	1,0490	1,0051	4,61
Maturação	7	12,35 °P	3,75 °P	69,64	1,0498	1,0053	4,59
	8	12,35 °P	4,25 °P	65,59	1,0498	1,0059	4,33

Fonte: O autor.

O consumo de substrato foi satisfatório em todos os experimentos, aproximando-se de 70% de atenuação. De acordo com o fabricante, a atenuação máxima para a US-05 é de 81%. Observou-se que os experimentos 3 e 4 apresentaram as menores atenuações de 67,32% e 67,08%, respectivamente. As folhas de louro foram adicionadas após 38 horas de fermentação e podem ter impactado negativamente o final da fermentação.

Tabela 5 - Parâmetros do processo fermentativo.

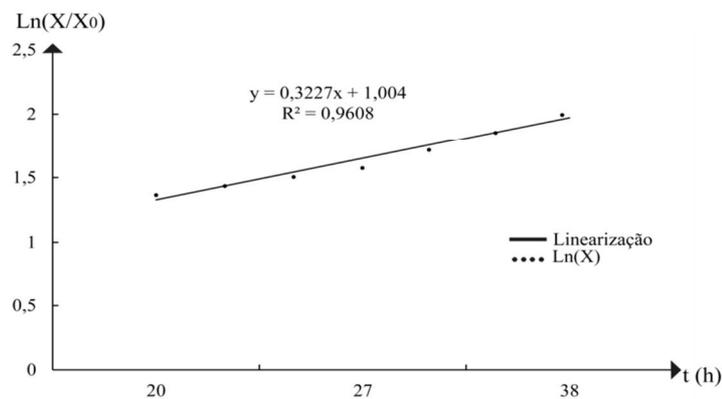
Etapa	Exp	$Y_{P/S}$	$Y_{X/S}$	$Y_{P/X}$	ξ (%)	P (g/L.h)
Branco	1	0,4210	0,1767	2,3824	82,33	0,4147
	2	0,4212	0,1765	2,3865	82,36	0,4128
	3	0,4214	0,1761	2,3930	82,40	0,4028
Fermentação	4	0,4210	0,1768	2,3807	82,32	0,4009
	5	0,4215	0,1788	2,3575	82,42	0,4062
Fervura	6	0,4205	0,1778	2,3649	82,22	0,4133
	7	0,4211	0,1766	2,3843	82,34	0,4115
Maturação	8	0,4218	0,1753	2,4059	82,47	0,3882

Fonte: O autor.

A produção de etanol foi satisfatória, visto que a eficiência de processo em todos os experimentos ficaram em torno de 82%. Os parâmetros cinéticos não apresentaram alterações significativas na presença de moléculas provenientes das folhas de louro, sendo compatíveis com valores encontrados na literatura.

Levou-se em consideração que a fase exponencial de crescimento celular ocorreu no período entre 20 e 38 horas para os experimentos 1, 2, 3 e 4 e, para os experimentos 5, 6, 7 e 8, ocorreu no período entre 15 e 38 horas de fermentação. O Figura 14 apresenta a linearização na fase exponencial de crescimento. O mesmo procedimento foi aplicado em todos os experimentos para a determinação da velocidade específica máxima de crescimento. A Tabela 5 traz de forma resumida os valores de cada experimento.

Figura 14 - Linearização na fase exponencial de crescimento.



Fonte: O autor.

Tabela 6 - Velocidade específica máxima e linearização.

t (h)	20	27	38	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R^2
Ln (X_1/X_0)	1,3643	1,5740	2,0097	0,3227	0,9608
Ln (X_2/X_0)	1,2917	1,5411	2,0541	0,3812	0,9616
Ln (X_3/X_0)	1,2882	1,4687	1,9741	0,3430	0,9304
Ln (X_4/X_0)	1,3610	1,4747	1,8871	0,2630	0,9030
t (h)	15	23	38	$\mu_{\text{máx}}$ (h^{-1})	R^2
Ln (X_5/X_0)	1,1073	1,5012	1,8791	0,3859	0,9999
Ln (X_6/X_0)	1,2018	1,4163	1,8004	0,2993	0,9739
Ln (X_7/X_0)	1,2552	1,7918	1,9144	0,3296	0,8838
Ln (X_8/X_0)	1,1679	1,8260	1,9595	0,3958	0,8723

Fonte: O autor.

Comparando os valores de $\mu_{\text{máx}}$, pode-se constatar que os valores estimados estão dentro da faixa adequada e encontram-se próximos sem grandes dispersões. O período de fase exponencial dos experimentos comportou-se praticamente de forma linear, onde poucos experimentos não apresentaram um R^2 satisfatório.

Uma degustação do produto final foi realizada com as pessoas do próprio laboratório, revelando uma preferência pelos experimentos 3 e 4 apresentavam um melhor paladar ao consumidor. Os experimentos 7 e 8 apresentaram um sabor levemente adstringente.

6 Conclusão

O objetivo de avaliar a utilização das folhas de louro como adjunto na produção de cervejas foi cumprido. A levedura US-05 demonstrou-se tolerante às substâncias do óleo essencial das folhas de louro, ocorrendo pouco impacto na concentração celular e consumo de substrato. Isso indica ausência ou concentrações baixíssimas de substâncias citotóxicas ou antienzimas nas folhas de louro, que poderiam interagir de forma negativa com as leveduras.

Nos experimentos 3 e 4, as folhas de louro adicionadas causaram uma morte celular mais acelerada, aumentando a decantação celular. Esse fato pode ser utilizado para obter-se uma cerveja mais límpida ao final do processo. Mesmo com pouco tempo de atuação, as folhas transferiram parte de seus óleos essenciais para o produto final. Fato constatado pela percepção de aroma e sabor do produto final. A fermentação demonstrou-se uma ótima etapa para adição das folhas.

A substituição parcial do lúpulo pelas folhas nos experimentos 5 e 6 foi satisfatória. Visto que não ocorreu formação de biofilme e instabilidade no produto, a contaminação ao longo do processo foi evitada, comprovando a eficácia de substâncias fungicidas, bactericidas demonstrada em outros estudos. Também acrescentou um leve aroma doce e amargor no produto final, sendo o loureiro um grande aliado para produção de cervejas artesanais.

A equipe do laboratório escolheu com unanimidade que os experimentos 3 e 4 foram melhores em aroma e paladar. Os experimentos 7 e 8 apresentaram um sabor adstringente leve. Fato possivelmente causado pelo longo período de infusão das folhas de louro na maturação, que provavelmente transferiram uma quantidade significativa de taninos para a cerveja.

Estudos anteriores apontam que a ingestão de diversas substâncias da folha de louro apresentam propriedades medicinais. Não foi possível realizar análises quantitativas e qualitativas através de cromatografia e espectrometria de massa, porém

Passos para as próximas pesquisas:

- Cromatografia gasosa e espectrometria de massa.
- Utilização de outros vegetais morfologicamente parecidos.
- Ampliação de escala para piloto e industrial.

7 Referências bibliográficas

ALVES, D. M. G. Fatores que Afetam a Produção de Ácidos Orgânicos bem Como Outros Parâmetros da Fermentação Alcoólica. 1994. 251 f. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas)-Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1994.

ANTONIAZZI, L., Gouveia, G. De, Frangella, V. S., Oliveira, M., & Exel, D. A. (2012). Quinoa : propriedades nutricionais e aplicações Quinoa : nutritional properties and applications, *11*(1), 56–61.

AQUARONE, Eugênio. *et al. Biotecnologia Industrial*. vol.IV. São Paulo: Blucher, 2001.

BARROS, A. A. De, & BARROS, E. B. De. (2010). *A Química dos Alimentos: Produtos Fermentados e Corantes*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química. 88p.-(*Coleção Química no cotidiano*) (Vol. 4).

BELTRAMELLI, Maurício. *Cervejas, brejas e birras: um guia completo para desmistificar a bebida mais popular do mundo*, São Paulo: Leya, 2012.

BLUE, A. D. (2004). *The Complete Book of Spirits: A Guide to Their History, Production, and Enjoyment*. New York: HarperCollins. pp. 137, 181, 201.

BREWERS ASSOCIATION. Disponível em: <https://www.brewersassociation.org/>. Acesso em: 26 set. 2019.

BRIGGS, D.E; BOULTON, C.A; BROOKES, P.A; STEVENS, R. *Brewing: science and practice*. England: CRC Press, 2004.

CARDOSO, S. (2013). São Paulo 2013, 1–53.

CORREA, A. C. (2015). Qualidade da bebida destilada a partir do mosto combinado de malte de cevada e caldo de cana-de-açúcar, 1120.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2002. p. 106-9.

FONTAN, R. da C. I., Veríssimo, L. A. A., Silva, W. S., Bonomo, R. C. F., & Veloso, C. M. (2011). Cinética da fermentação alcoólica na elaboração de vinho de melancia. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 29(2), 203–210.

HENDGES, D. H. (2014). Produção de cervejas com teor reduzido de etanol, contendo quinoa malteada como adjunto, 95. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Industry Development Division Department of Agriculture, Food and the Marine October 2014
Number of pages : 17 Language : Eng. (2014), (October).

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sunderland: Sinauer, 1999. p. 226-7.

KIVÇAK, B.; MERT, T. Preliminary evaluation of cytotoxic properties of *Laurus nobilis* leaf extracts. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 73, n. 3, p. ,242-3, 2002.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILA, M. Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, n. 65, p. 85-98, 1998.

Lorena, E. D. E. E. D. E., & Guedes, R. P. (2013). Obtenção de uísque cortado a partir de destilados alcoólicos simples de malte de cevada (*Hordeum vulgare*) e de quirera de arroz preto IAC-600 (*Oryza sativa*), 600.

MORADO, R. Larousse da Cerveja. Larousse do Brasil. 1 ed, São Paulo, 2011.

Mestrado, D. De, Doutora, P., & Oliveira, B. (2014). Caracterização química de folhas e atividade antioxidante de extratos de *Laurus* sp .

PAULISTA, U. E., Filho, M., Preto, R., & Barbosa, R. D. (2010). Tiago sartorelli prato influência da secagem sobre compostos medicinais e de pungência do gengibre.

PRAZDROJ. Disponível em: www.prazdroj.cz. Acesso em: 26 set. 2019.

PULZATTO, M. E. Fatores que Influem na Obtenção de Biomassa de Levedura Seca (*Saccharomyces Cerevisiae*) da Fermentação Alcoólica. 2000. 112 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos)-Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2000.

ROSA, Sérgio Eduardo Silveira, COSENZA, José Paulo, LEÃO, Luciana Teixeira de Souza. Panorama do Setor de Bebidas no Brasil. Rio de Janeiro: BNDES, 2006.

SCHMIDT, S. A.; DILLON, S.; KOLOUCHOVA, R.; HENSCHKE, P. A.; CHAMBERS, P. J. Impacts of variations in elemental nutrient concentration of Chardonnay musts on *Saccharomyces cerevisiae* fermentation kinetics and wine composition. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Münster, v. 90, n. 2, p. 679-687, 2011.

SANTOS, G. R. Otimização do processo de mosturação utilizando feijão preto (*Phaseolus vulgaris* black turtle) como adjunto para a produção de cerveja. 2018. Monografia – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

SAKURAI, F. N., Estrela, K. C. A., Tamayo, M. S., Casseb, M. O., & Nakasato, M. (2016). Caracterização Das Propriedades Funcionais Das Ervas Aromáticas Utilizadas Em Um Hospital Especializado Em Cardiopneumologia. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, 11(4), 1097–1114.

SANGUINETTI, E. E. Plantas que curam. Porto Alegre: Rígel, 1989. p. 145.

Scotch Whisky Association. (2009). The Scotch Whisky Regulations 2009 Guidance for Producers and Bottlers. *Regulation*.

SILVA, J. B. Almeida e. Cerveja In: VENTURINI FILHO, W. G, Tecnologia de Bebidas. São Paulo: Edgard Blucher, p. 347-380, 2005.

SILVA, R. A. D. Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil. São Paulo: Nacional, 1926. p. 566.

SIMI, M.; KUNDAKOVI, T.; KOVACEVI, N. Preliminary assay on the anti-oxidative activity of *Laurus nobilis* extracts. *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 74, n. 6, p. 613-6, 2003.

SUMAN, P. A., Urbano, L. H., Leonel, M., & Mischan, M. M. (2011). Efeitos de parâmetros de fermentação na produção de etanol a partir de resíduo líquido da industrialização da mandioca (manipueira). *Acta Scientiarum. Technology*, 33(4), 379–384.

RAO, B. G. V. N. & Nigam, S. S. 1970. The in vitro antimicrobial efficiency of essential oils. *Indian Journal of Medical Research* 58(5): 627-633.

