

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA**

**JOSÉ LUIS RAMÍREZ ALCÁNTARA**

**OBTENÇÃO DE BEBIDAS DIFERENCIADAS UTILIZANDO O  
*DASYLIRION SPP* COMO ADJUNTO DE MALTE.**

**Lorena - SP**

**Dezembro/2013**



**José Luis Ramírez Alcántara**

**OBTENÇÃO DE BEBIDAS DIFERENCIADAS UTILIZANDO O  
*DASYLIRION SPP* COMO ADJUNTO DE MALTE.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Escola de Engenharia de Lorena  
da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. João Batista de Almeida e Silva

Lorena - SP

2013

## ÍNDICE

<b>1</b>	<b>RESUMO</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>Cerveja</b>	<b>5</b>
<b>3.2</b>	<b>Sotol</b>	<b>6</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>10</b>
<b>4.1</b>	<b>Produção de cerveja</b>	<b>10</b>
4.1.1	Materiais	10
4.1.2	Matéria-prima	10
4.1.3	Cozimento das pinhas	10
4.1.4	Triturado das Pinhas	11
4.1.5	Preparação do inóculo	101
4.1.6	Maceração	<b>Erro! Indicador não definido.2</b>
4.1.7	Filtração	122
4.1.5	Fervura	122
4.1.6	Fermentação	<b>Erro! Indicador não definido.3</b>
4.1.7	Clarificação	<b>Erro! Indicador não definido.3</b>
<b>4.2</b>	<b>Análises microbiológicas</b>	<b>Erro! Indicador não definido.3</b>
<b>4.3</b>	<b>Análises sensoriais</b>	<b>Erro! Indicador não definido.4</b>
<b>4.4</b>	<b>Análises estatísticas</b>	<b>Erro! Indicador não definido.4</b>
<b>5</b>	<b>CRONOGRAMA DE IMPLEMENTAÇÃO DAS MISSÕES</b>	
	<i>Erro! Indicador não definido.15</i>	
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>16</b>

# 1 RESUMO

Uma bebida conhecida há milhares de anos, com CO<sub>2</sub>, baixo teor alcoólico, preparada a partir de malta de cevada, lúpulo e água de grande qualidade, que pela ação de leveduras, os açúcares provenientes da malta são transformados em CO<sub>2</sub> e etanol, é a cerveja. Com esta composição em matérias-primas foi estabelecida a lei da pureza alemã, conhecida como Reinheitsgebot de 1516, uma das mais antigas do mundo que trata das características dos alimentos. Sem embargo, pela legislação brasileira, parte da malta de cevada pode ser substituída por cereais maltados ou não e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não e que são conhecidos como adjuntos. Estes adjuntos tem a finalidade de contribuir como uma fonte alternativa de substrato por ter geralmente preços inferiores aos da malta de cevada e por proporcionar à bebida características organolépticas peculiares em função da fonte de origem. A partir desta definição, estabelecida no Artigo 64 do Decreto 6.871 de 4 de julho de 2009 , que regula a Lei brasileira 8.918 e que trata sobre a produção de bebidas, está se desenvolvendo investigações utilizando matérias-primas que servem tanto como adjunto como aromatizantes no processo cervejeiro, entre estas, as bananas, o arroz negro “la punta”, o suco de cana, beterraba, etc.

Em virtude disso, está se desenvolvendo novas pesquisas de outras fontes alternativas que podem ser utilizadas como adjuntos que confirmam novas e desejáveis características para obtenção de novos produtos e que reduzam o custo do processo em geral. Neste caso particular, pretende-se utilizar a pinha da planta *Dasyilirion spp* para a obtenção de uma bebida com características novas e inovadoras.

Neste sentido o objetivo do presente projeto é a fermentação para obtenção de uma cerveja com características aromáticas distintas das outras já conhecidas no mercado utilizando o mosto de pinhas de sotol, misturado com proporções de malte que permita tanto melhoria do rendimento da fermentação pelas características nutricionais que possui quanto alterações nas características aromáticas das bebidas assim obtidas.

## 2 INTRODUÇÃO

Os produtores que habitam as zonas áridas desenvolveram a capacidade de obter produtos das plantas com que tem contato no meio e nas comunidades, tal como a “candelilla” (*Euphorbia antisiphylitica*) e a “lechuguilla” (*Agave lechuguilla*); delas se obtém cera e “ixtle”, que representam a fonte de renda mais importantes e, na maioria dos casos, a única atividade, já que a agricultura sazonal só lhes permite obter colheita para autoconsumo pela incerteza e escassez das chuvas.

O sotol (*Dasyilirion cedrosanum* Trel.) é uma planta nativa do Deserto Chihuahuense, a qual se desenvolve em diversos tipos de terreno, preferentemente em cerros de solos rasos e bem drenados, onde coexiste com uma grande variedade de formas de vida; é uma planta muito rústica e componente do matagal desértico rosetófilo, mas ocasionalmente forma parte do matagal desértico micrófilo. Entre alguns dos usos se encontram a elaboração de aguardente, destilado conhecido como sotol, além de comida para o gado e a construção de cercos no médio rural.

Após receber os direitos para a produção de uma bebida que leva o nome da planta de origem, os estados de Chihuahua, Coahuila e Durango passaram a se interessar pela produção em massa da mesma. Isso força realizar o aproveitamento das populações naturais de maneira racional e sustentável, visualizando oportunidades no mercado nacional e internacional e promovendo a geração de ingressos econômicos para os donos e possuidores do recurso; por isso, é necessário o conhecimento das espécies, assim como a localização, além das características das plantas que conformam as populações naturais.

O sotol pertence ao gênero *Dasyilirion*, da família *Agavaceae* (Henrickson e Johnston, 1977). Este gênero inclui em torno de 14-18 espécies e distribuem-se no sudoeste dos Estados Unidos e norte do México (Henrickson e Johnston, 1977 e Bogler (1994)).

Segundo Bogler (1994), no México existem 14 espécies desse gênero, as quais são:

*Dasyilirion ecotrichum*; *D. glaucophyllum* (estado de México.); *D. graminifolium*; *D. inermis* (San Luis Potosí); *D. leiophyllum* (Chihuahua e oeste de Coahuila); *D. longissimum*, (México); *D. miquihuanense* (Tamaulipas); *D. parrianum*

(San Luis Potosí); *D. serratifolium* (sudeste de México); *D. simplex* (Durango, México); *D. texanum* (norte de Coahuila); *D. texanum* var. *Avernas* (México); *D. wheeleri* (Sonora, Chihuahua e Durango); *D. cedrosanum* (centro e sul de Coahuila); *D. heteroteca* (norte de Coahuila).

O sotol *Dasyliirion cedrosanum* Trel. (*D. palmeri* Trel.) é uma planta com tamanho médio para robusto com um caule principal e em alguns casos com dois ou três caules secundários, folhas regulares, estendidas, de cor cinza pálido a verde pálido, com 80 a 100 cm de comprimento, e de 2 a 3.5 cm de espessura, ascendendo retamente, plano acima. Esta espécie se desenvolve no matagal desértico rosetófilos do centro e sul do estado da Coahuila, em altitudes de 1000 a 2000 m (Henrickson y Johnston, 1977).

O sotol é uma planta da qual se utilizam as “pinhas” para elaborar industrialmente a bebida alcoólica chamada “sotol”. Por ser uma bebida com sabor autêntico, tradicionalmente produzida na região desértica de Coahuila, se lhe outorga a esta região juntamente com os estados de Chihuahua e Durango a denominação de origem. Em esta região, o aproveitamento das populações naturais de sotol está regulada pelas normas NOM-005-RECNAT-1997, NOM-007-RECNAT-1997 e a NOM-159-SCFI-2004. Desde a denominação de origem a indústria precisa satisfazer um volume constante e uniforme de pinhas, mesmo que atualmente se extraem de populações naturais e são de qualidade heterogênea, impondo uma forte pressão ao recurso. Para evitar a deterioração das populações naturais e uniformizar a qualidade do produto, se requiere de uma gestão sustentável na região, onde se promova entre outras coisas o estabelecimento de plantações comerciais que facilitem o aproveitamento, gestão em campo e satisfaçam a demanda do produto. O programa de plantações requer um abastecimento constante de material vegetativo, que pode ser obtido mediante micro propagação, onde, de maneira intensiva, podem-se produzir plantas de sotol em quantidades suficientes, permitindo com isto a programação dos ciclos de produção e abastecimento constante de pinhas na indústria, como se faz no esquema de produção de tequila.

As plantações comerciais requerem um grande e constante volume de plantas uniformes com alta qualidade fitossanitária.

O sotol é uma bebida alcoólica muito apreciada há mais de 800 anos. Essa foi inventada pelas tribos Tarahumaras, e Anazasis. Assim como a tequila, é uma variedade de mezcal. A elaboração da bebida se realiza em tonéis principalmente, sem normas de qualidade apropriadas para uma comercialização em grande escala.

A legislação brasileira (BRASIL, 1997) define cerveja como sendo a bebida obtida pela fermentação alcoólica de mosto oriundo de malte de cevada e água potável, por ação de levedura, com adição de lúpulo.

Parte do malte de cevada poderá ser substituída por adjuntos (cevada, arroz, trigo, centeio, milho, aveia e sorgo, todos integrais, em flocos ou a sua parte amilácea) e por carboidratos de origem vegetal, transformados ou não.

Ainda, segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1997), quanto à proporção de malte na formulação, as cervejas podem ser classificadas em:

a) puro malte, aquela que possuir 100% de malte de cevada, em peso, na base do extrato primitivo, como fonte de açúcares; b) cerveja, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior ou igual a 50%, em peso, na base do extrato primitivo, como fonte de açúcares; c) cerveja com o nome do vegetal predominante, aquela que possuir proporção de malte de cevada maior do que 20% e menor que 50%, em peso, na base do extrato primitivo, como fonte de açúcares.

Na fabricação das cervejas, podem ser adicionados adjuntos que são definidos como matérias-primas ricas em carboidratos que substituem parcialmente o malte, desde que permitidos por lei. São utilizados, principalmente, por razões econômicas, pois apresentam menor custo na produção de extrato em relação ao malte e, além disso, melhoram a qualidade físico-química e sensorial da cerveja acabada (VENTURINI FILHO, 2000). Os adjuntos são classificados em amiláceos e açucarados, conforme o tipo de carboidrato que predomina em sua composição. Os exemplos mais comuns de adjuntos amiláceos são o arroz, o milho, a cevada, o trigo e o sorgo, enquanto que a maltose (oriunda principalmente do milho) é um exemplo de adjunto açucarado (VENTURINI FILHO, 2000).

Algumas cervejarias usam uma mistura de malte e cevada não maltada para fabricação de cerveja. Com menos de 30% de cevada, as enzimas do malte podem ser suficientes para degradar o amido e a proteína durante o processo de mosturação (HOUGH, 1991).



Segundo Stewart (1995), a cevada não maltada pode substituir o malte em até 50%, exigindo o emprego de enzimas comerciais, além de diferente programação de tempo e temperatura de mosturação.

Análises convencionais realizadas em cerveja não quantificam a proporção de malte e de adjuntos empregados na sua formulação, dificultando a fiscalização e detecção de produtos fora dos padrões de identidade e qualidade exigidos por lei. A utilização da metodologia de isótopos estáveis dos elementos químicos carbono ( $^{13}\text{C}$ ) e nitrogênio ( $^{15}\text{N}$ ) permite quantificar, em alguns casos, essa proporção. Isso pode ser uma importante ferramenta no combate a possíveis fraudes.

O objetivo do presente trabalho foi produzir cervejas utilizando as pinhas do sotol como adjunto de malte e compará-las, quanto às características físico-químicas e sensoriais, com a cerveja padrão produzida com 60% de malte e 40% de malta de sotol.

### **3 REVIÇÃO BIBLIOGRÁFICA**

Em 2006, Brasil ocupava a quinta posição no ranking dos maiores produtores mundiais de cerveja, sendo só superado pela China, os Estados Unidos, a Alemanha e a Rússia.

#### **3.1 Cerveja**

Por milhares de anos a cerveja tem sido tradicionalmente consumida, e pode ser definida como uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir da fermentação do malte de cevada, contendo lúpulo e água de qualidade, podendo utilizar também outras matérias primas, como arroz, trigo o milho.

Segundo Angelino (1991), o processo de elaboração do mosto cervejeiro começa quando o malte de cevada é obtido por um processo de germinação de grãos de cevada com condições controladas de humidade e temperatura, seguido de um incremento de temperatura a fim de provocar a morte do embrião. Molha-se o malte da cevada em seguida se mistura com água cada vez mais quente num aumento gradual de temperatura em tempos predeterminados. Durante esse processo, denominado maceração as enzimas presentes no malte são ativadas e realizam hidrólises dos constituintes do malte e a conseqüente liberação deles.

As ações das enzimas produzem um mosto que contem aproximadamente 70-80% de carboidratos fermentáveis, incluindo glucose, maltose, frutose, sacarose e maltotriose (STEWART, 2000).

Depois da extração, o mosto clarifica-se utilizando a mesma casca do malte como uma rede filtrante, obtendo-se uma solução denominada mosto doce. Esse mosto é fervido em presença de lúpulo, a partir do qual se adquire o amargor. Depois de fervido, e como consequência, se obtém a concentração desejada de açúcares, ocorre precipitação de proteínas, poli fenóis e outros materiais insolúveis que constituem o chamado “grano gastado”. Este “grano gastado” é removido do mosto e é esfriado até chegar à temperatura de fermentação e depois normalmente é areado até chegar à temperatura de saturação, ficando pronto para ser inoculado e fermentado.

A etapa que consiste na decomposição dos açúcares fermentáveis em álcool, CO<sub>2</sub>, energia como ATP (adenosina trifosfato) e calor, por ação das leveduras cervejeira em condições anaeróbicas, além da produção de compostos de aroma e sabor de cerveja, é conhecida como fermentação alcoólica (MUNROE, 1994; ALMEIDA e SILVA, 2005).

Segundo Hough (1985) as leveduras são classificadas pelo comportamento delas durante o processo fermentativo, podendo decantar no fundo do fermentador, ou flutuar acima do mosto. Em virtude deste fenômeno existe a denominação de leveduras de fermentação de fundo (bottom) e de fermentação de cima (top). Reinold (1997) y Russel (1995).

### **3.2 Sotol**

Da planta de Sotol não se sabe qual é o tempo de vida dela, mas é conhecido que algumas plantas cultivadas em quintais ou estufas podem a viver mais de 150 anos. Esta planta tem grande influencia econômica na historia das regiões onde cresce de maneira natural e endêmica, já que desde os tempos pré-hispânicos foi utilizada como fonte de alimento tanto para humanos (consumia-se o fruto não maduro e cozido), como para animais (se consumem as cabeças e as bases das folhas para alimentar animais em épocas secas, já que estas têm alto conteúdo de carboidratos); além disso, pode-se utilizar como suporte ou material de construção (as propriedades da fibra lhes permite utiliza-la para fabricar papel e pela sua capacidade impermeável, se usa para fazer telhados de casas);

para fabricar materiais artesanais (cestos, esteiras, entre outros); como planta ornamental em praças públicas e igrejas (algumas espécies tem na base das folhas uma forma peculiar que recebe o nome de “colherinhas” e são empregadas para decorar o exterior e interior de ranchos e povoados, especialmente em festas religiosas); e, predominantemente para a produção de bebidas alcoólicas (*Dasyilirion cedrosanum*, Sotol, Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial).

O Sotol (*Dasyilirion ssp.*) é uma planta perene, poli cárpica e semicilíndrica grande que adquire uma forma específica ao desenvolver as folhas muito perto do centro para a periferia. As folhas mais velhas não caem quando morrem, elas formam parte do caule e ajudam-lhe a proteger-se e funcionam também como suporte. O caule não é muito alto, mas se encontram alguns indivíduos de idade avançada com caule de até 3 metros de altura e outros podem contar com cabeças ou pinhas de mais de 100 quilogramas de peso, sendo mais comuns em Coahuila as de 80 kg (Blogger, Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial). Essas plantas caracterizam-se por ser dióicas, já que existem plantas machos e plantas fêmeas. Ambos os sexos contam com um escapo que pode ser muito alto, na parte mais alta da planta encontram-se os estames em machos (como espinhas) ou os pistilos em fêmeas. Pelo número de estruturas sexuais que têm nos escapos sabe-se que produzem uma quantidade considerável de sementes, pelo que se estima, um ciclo de formação de sementes completo ocorre a cada seis anos e vai diminuindo as probabilidades de reprodução quando o pólen é transportado pelo ar em direção aos pistilos de uma planta fêmea, perdendo-se muitas células gaméticas masculinas durante o processo; além disso, porque a produção de semente não é constante a cada ano (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial).

No México se tem identificado quase 16 espécies, somente no estado de Coahuila, identifica-se seis ou sete espécies, as quais têm maior importância econômica devido ao maior diâmetro da pinha e, por conseguinte o alto conteúdo de carboidratos. São as espécies de *Dasyilirion duranguense* (que predomina na região de laguna) e que se aproveita principalmente para produzir bebida alcoólica; *Dasyilirion cedrosanum* (localizada particularmente no centro e sul do estado) sendo a de maior utilidade para a fabricação da bebida alcoólica em comparação com a anterior pelo tamanho da pinha, *Dasyilirion wheeleri* (que prevalece no norte do

estado) que também é usado para fabricar o licor e *Dasyllirion acrotiche* aproveita-se a fibra para fazer diversos materiais (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial).

As espécies de *Dasyllirion* com risco de extinção por crescerem em zonas muito restringidas e, além disso, porque não são boas para utilizar-se como matéria prima na indústria de sotol pelo tamanho da planta e em consequência, pelo tamanho reduzido da pinha. São as espécies *Dasyllirion texanum* que se encontra desde Texas até o sul de Monclova, *Dasyllirion berlandieri* var. *Berlandieri* que restringe-se aos bosques de Arteaga e duas subespécies de *Dasyllirion leiophyllum*: var. *Leiophyllum* e *Galucum* que encontram-se em Fco. I. Madero, Ocampo, parte de Sierra Mojada e em Monclova respectivamente (Lopes Barbosa).

A bebida de sotol é obtida a partir das pinhas da planta, e fabricada a escala industrial da seguinte maneira: depois de extrair, se retiram as folhas das plantas maduras e só se deixam as cabeças, as quais posteriormente são parcialmente hidrolisadas ou cozidas para depois ser “esmagadas” ou molhadas e, o produto desta hidrolise (o suco), que é rico em carboidratos é sometido a fermentação alcoólica já seja por cepas comerciais de leveduras ou com cepas do próprio suco, depois deste processo, o fermento obtido é destilado em torres de cobre e posteriormente envasado ou diluído com água potável ou desmineralizada dependendo da concentração de álcool desejada (Produção de Sotol).

As espécies do género *Dasyllirion* desenvolvem-se em territórios como sul de Texas, Chihuahua, Coahuila e toda a extensão conhecida como “El Desierto Chihuahuense”. A partir de 8 de agosto de 2002 concedeu-se a denominação de origem e a marca comercial da bebida sotol por meio da “Declaración de protección a la Denominación de Origen Sotol” publicada no “Diario Oficial de La Federación”, para os estados de Coahuila, Durango e Chihuahua por ser os estados na área em conjunto onde a planta cresce de maneira endêmica e por consequência se tem ao longo da historia uma exploração da mesma com maior influencia na sociedade.

Nos últimos anos a partir da Denominação de Origem tanto da matéria-prima como da bebida elaborada a partir desta: “Sotol”, se incrementou consideravelmente a demanda e a produção industrial de esta bebida tradicional a partir de espécies de *Dasyllirion* localizadas nessas regiões, o que tem aumentado o número de solicitações para aproveitamento da espécie, e se prevê que no futuro imediato se incrementará muito mais, com o consequente incremento na pressão de exploração.

Atualmente se tem concedido permissões para que algumas comunidades rurais comecem a exploração comercial da planta para a elaboração da bebida. Isto põe em risco as diferentes espécies da planta que não são aptas para serem utilizadas como matéria-prima, assim como aquelas que são aptas, já que se desconhece a diversidade genética entre as populações desta espécie e a variação genética dentro das populações de plantas de sotol. Além disso, para uma exploração comercial sustentável é necessário definir os diversos parâmetros de produção como são: a identificação das melhores cepas de microrganismos que lhe confirmam o buque característico da bebida, definir o melhor processo de fermentação, identificar as enzimas que intervêm na degradação do mosto. Sem dúvida são, todavia muitos os aspectos nos quais se teria que trabalhar, sem embargo pessoal de algumas instituições como a Narro já tem estabelecido as regiões de maior concentração da planta de sotol no estado de Coahuila, o INIFAP estabeleceu alguns parâmetros para a produção agrícola, assim como já concluiu um sobre a caracterização química da bebida. Este estudo identifica os principais componentes químicos dessa bebida.

Sem dúvida os aspectos mais importantes que tem que se considerar em um futuro próximo é o estudo da diversidade genética dentro das populações de sotol o qual permitiria selecionar os melhores genótipos para a produção de licor e, além disso, é sumamente importante para manter a biodiversidade das espécies do género *Dasyilirion*, fazer uma exploração comercial sustentável e evitar a possível perda de genes e das espécies em risco de extinção.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 *Produção de cerveja*

#### 4.1.1 MATERIAIS

As matérias primas utilizadas na produção de cerveja serão:

- 1 Água.
- 2 Malta de cevada clara tipo Pilsen, em sacos de 50 Kg;
- 3 Lúpulo: Na elaboração do mosto serão utilizados dos tipos de lúpulos da marca Hopsteiner®.
  - \* Lúpulo de amargor (Pellets, con aproximadamente 7% de ácido alfa);
  - \* Lúpulo aromático (Extrato, 30% de ácidos alfa).
- 4 Sotol obtido da região de Coahuila
- 5 Cepa comercial de levedura *Saccharomyces cerevisae* de baja fermentação.

#### 4.1.2 MATÉRIA-PRIMA.

As plantas de sotol as adquirem da região sul oeste de Cedros, aproximadamente a unos 2-5 km, de localidades vizinhas, tem certo controle sobre a variedade de sotol que se corta, o melhor é o chamado sotol amarelo (não é conhecida à variedade) que cresce nas lomas de San Antonio Mazapil, com um peso de pinhas de 20 a 40 KG, em segundo lugar esta o sotol branco e o terceiros são os sotoles pequenos (menores a 10 Kg).

A época de corte preferencial é nos meses de janeiro a maio, em outros meses, e sobre todo se tem chuvas, a produção vai para embaixo.

O processo de conservação do recurso florestal é selecionando as plantas que se vão cortar e deixando crescer as menores.

#### 4.1.3 COZIMENTO DAS PINHAS.

As pinhas se cosem colocando-as em um montículo em forma de pirâmide de pedras, que estão colocadas em uma estrutura de barro oca, no interior dela entra o calor que se gera pela queima de palma na parte de embaixo do montículo. O forno tem alguns buracos onde o fumo sai. Quando as pedras estão bem quentes se cobrem com as pinhas e estas se arroupam com o “sudadero”,

(que são restos de pinhas já fermentadas), ao segundo dia se regam as piñas com 400 lts de água para gerar vapor e propiciar um calor húmido.

O tempo de cozimento é de três dias e três noites (aproximadamente 72 hrs).

#### **4.1.4 TRITURADO DAS PINHAS.**

Quando se tem umas 70–80 pinhas (uma média de peso de 3.000Kg), se cortam (se separam as conchas) as pinhas no “Mortero” (pequena construção de três paredes de adobe, sem teto nem parede na frente) e se amontoam uma encima de outra formando um volume de 0.6 m x 1m x 1.50 m = 0.9 - 1.0 M, em um processo que chamam “Majado”, onde as pinhas esmigalhadas (conchas) permanecem no morteiro por 72 hrs, as primeiras que se colocam e por 30 hrs as últimas.

Aqui se inicia a transformação de polissacáridos em açúcares, em um processo de fermentação sólida a uma temperatura interior de uns 40 °C no ar livre.

#### **4.1.5 PREPARAÇÃO DO INOCULO.**

A partir de cultivos puros, serão replicados quatro tubos de ensaio contendo agar malte inclinados e mantidos em estufa a 30 °C por 24h. Depois de esse tempo, as cepas serão transferidas por lavado superficial de agar inclinado e em condições assépticas para um frasco Erlenmeyer de 500 ml, com 200 ml de mosto estéril a 12 °P. O frasco será incubado a 30 °C, com agitador rotatório (Cintec CT 713) a 200 RPM por 18h. Posteriormente, o inoculo obtido será nivelado a 2L com a adição em condições assépticas, de 1,8L de médio de fermentação a 18 °C, em um frasco Erlenmeyer de 4L, sendo mantido no agitador rotatório com a mesma temperatura utilizada no processo fermentativo (15°C).

Depois de esse tempo, o inoculo será aumentado a 20L com a adição de 18L de mosto estéril a 25 °P, e adicionados diretamente ao fermentador. As células serão mantidas com uma areação de 0,01 vvm. A mesma temperatura utilizada no processo fermentativo (15 °C), pelo tempo necessário para alcançar uma concentração celular entre 1 a  $2 \times 10^7$  cel/ml ao início da fermentação na Planta Piloto.

#### **4.1.6 MACERAÇÃO**

O tempo de maceração é de 3 a 5 dias, com temperaturas de 10-20 °C. O volume de água é de 300 a 350 l/100 l de cevada, atingindo o conjunto, 2/3 do volume do tanque. A água pode ser trocada quando a temperatura aumenta muito e é utilizada para fermentações industriais, pois é rica em açúcares, substâncias nitrogenadas e sais minerais. Adição de SO<sub>2</sub> ou hipoclorito á agua promove a assepsia e facilita o intumescimento. A operação será conduzida em um tanque com capacidade de 125L com agitador (32 RPM), resistência eléctrica, e panel de controle, assim como, termómetro digital de temperatura, e com ajuste de pH inicial em 5,4 pela adição de ácido láctico, e tamponado com CaCl<sub>2</sub> na proporção de 1,26 g/Kg de malta.

#### **4.1.7 FILTRAÇÃO.**

A filtração da mistura para a obtenção do mosto será realizada em um recipiente (Tina de filtração) com capacidade de 120L fornecido de agitador, disco filtrante PAKSCREENS (fundo com sulco), bomba centrífuga, donde a casca de malte servirá como leito filtrante. Depois da filtração, o leito filtrante será lavado com 50L de agua (denominada agua secundaria) a 75°C.

#### **4.1.8 FERVURA**

Depois do procedimento de filtração, o mosto será transferido a um recipiente de fervido, que é um tanque encamisado de capacidade igual a 250L, fornecido de resistência eléctrica e assolamento térmico.

Ao começo do fervido será adicionado o suco obtido das pinhas do sotol já cozidas e trituradas e o lúpulo em extrato a uma concentração de 0,3 g/L em relação ao volume inicial de fervido. O mosto será mantido em ebulição, durante 60–90 min, até alcançar a concentração de 25°P para o inicio da fermentação, permitindo uma evaporação máxima de até um 10% do volume inicial. Ao final da fervida será adicionado o lúpulo em pellets em concentração de 0,9g/L em relação ao volume inicial de fervido.

O mosto será mantido em recirculação, entrando tangencialmente ao recipiente de fervido para permitir a precipitação de proteínas e poli fenóis. Depois de este período de tempo, o mosto será enfriado hasta 30 °C, circulando agua por uma camisa em una caldeira de fervido, e mantendo em repouso por 60 minutos.



Ao final do repouso será retirado o sedimento (comumente denominado de trub). Ao mosto frio, lhe será injetado oxigênio puro para obter uma concentração de oxigênio dissolvido no tanque de fermentação de 20 ppm.

#### **4.1.9 FERMENTAÇÃO**

Em este ponto, conforme o inciso 3.2.2.1., 20L de inóculo previamente elaborado permaneceram no fermentador. Por tanto, depois da fervida, serão transferidos aproximadamente 160L de mosto da caldeira para o fermentador, de forma de obter 180L ao início da fermentação.

A fermentação desenvolvera-se a uma temperatura 15 °C no fermentador de 220L fornecido de controlador e indicador digital de temperatura, manómetro analógico para indicação da pressão interna e de cinco registros para toma de mostras em diferentes profundidades.

A fermentação será controlada diariamente até ter um valor de 1 °P por encima da atenuação limite. Quando alcance esse valor, a bebida será sometida a um processo de maturação no mesmo tanque, entretanto a temperatura será reduzida a 0 °C, permanecendo assim por 10 dias. A carbonatação ocorre com pressão, a través da fermentação do açúcar residual e usando gás carbónico de pureza 99,5%.

#### **4.1.10 CLARIFICAÇÃO**

Se realiza com pressão de 2Kgf/cm<sup>2</sup> utilizando terra diatomácea e mediante filtros de placas KS-100, constituídas de celulosa. De forma ágil a bebida será envasada em garrafas de 600 y 330 ml, pasteurizadas e conservadas em câmara fria (10°) até o consumo.

### **4.2 Análises microbiológicas**

Ao início e durante toda a fermentação será realizado uma contagem total de leveduras em câmara de Neubauer (11400 mm<sup>2</sup> x 1110 mm) e o resultado é expresso em cel/mL. A determinação da viabilidade celular (células viáveis e não viáveis) será realizada pelo Método Internacional com azul de metileno segundo ASBC (1996).

### **4.3 Análises sensoriais**

Serão aplicadas provas de Análises Sensorial na mesma Planta Piloto de Bebidas de EEL, que conta com um ambiente climatizado, cabinas individuais e iluminação vermelha. O painel será completo por cerca de 150 consumidores de ambos sexos. Serão aplicadas as seguintes provas:

Será aplicado a Prova Triangular ou Prova de Comparação Pareada ou Preferencia de acordo com (ASBC, 1992). As mostras que serão utilizadas durante esta prova são as cervejas existentes no mercado. Aproximadamente 50 ml de mostras serão servidas individualmente a temperatura entre 9 -12°C em copas negras.

A Prova de Aceitabilidade a escala hedônica estruturada de nove pontos, sendo que o primeiro equivale a não me gosta extremamente e o nono me gosta extremamente. Em esta prova a mostra de cerveja será servida em copas de vidro com aproximadamente 200 ml a temperatura entre 9 – 12°C.

### **4.4 Análises estadísticas**

Para todas as análises serão calculadas medias e desvio padrão.

Para as análises sensoriais (prova triangular e preferencia) a significância estadística será obtida a partir da tabela específica de este método, publicada por ASBC. Para a prova de aceitação, serão calculadas medias e desvio padrão, e se aplicará a prova de Tukey com um nível de 5% de probabilidade.

O programa estadístico utilizado será o Statgraphics, versão 5.0.

## 5 CRONOGRAMA DE IMPLEMENTACIÓN DAS MISÕES

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO								
ATIVIDADES	MESES / ANO							
	2013					2014		
	SET	OUT	NOV	DEZ	JAN	FEV	MAR	ABR
1. Revisão de literatura	x							
2. Elaboração do projeto	x							
3. Análise do projeto	x							
4. Redação relatório preliminar		x						
5. Revisão pelos orientadores			x					
6. Redação do relatório			x					
7. Revisão do português			x					
8. Digitação final			x					
9. Reprodução e encadernação			x					
10. Entrega/Depósito do trabalho final			x	x				
11. Retorno ao México					x			
12. Viagem a Monclova, Coahuíla					x			
13. Obtenção de matéria-prima					x			
14. Produção da bebida Coleta de dados						x		
15. Coleta de dados							x	
16. Avaliação dos resultados							x	
17. Crítica dos dados								x
18. Análise dos resultados								x

## 6 REFERENCIAS.

ALMEIDA e SILVA, J.B. Tecnologia de Bebidas: matéria prima, processamento, BPF / APPCC, legislação e mercado In:Venturini Filho,W.G. Cerveja. São Paulo: Edgard Blucher, 2005.

ANGELINO, S.A.G.F. Beer. In: MAARSE, H. Volatile Compounds in Foods and Beverages. New York: Marcel Dekker, 1991, p.580-599.

AQUARONE, E.; ZACANARO JUNIOR, O. Vinagres. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. (Coords): Alimentos e bebidas produzidos por fermentação – Biotecnologia. São Paulo: E. Blücher, v.5, 1983, p. 104-122, 243p.

ASBC - Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists. 8<sup>th</sup> Rev. Edi. Minnesota: The Technical Committee and the Editorial Committe of the ASBC, 1996.

Bogler, D. J.Thesis of Doctor of Philosophy. “Taxonomy and philogeny of *Dasyilirion* (Nolinaceae)”. The University of Texas at Austin. August, 1994.

BRANYIK, T. VICENTE, A.A., MACHADO CRUZ, J.M., TEIXEIRA, J.A. Spent grains a new support for brewing yeast immobilization. Biotechnology Letters, v.23, p.1073-1078, 2001.

BRASIL. Decreto n. 6.871, de 04 de julho de 1997. Ementa que regulamenta a Lei n ° 8.918, de 14 de julho de 1994. Dispõe sobre as Normas gerais sobre registro, classificação e, ainda, inspe ção e fiscalização da produção e do comércio de bebidas. Boletim IOB, Brasília: Ministério da Agricultura, 1997.

*Dasyilirion cedrosanum.* Disponible en [http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/dasyilirion\\_cedrosanum.htm](http://www.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/dasyilirion_cedrosanum.htm)

DE CLERK, J. A textbook of brewing. London: Chapman & Hall, 1957. v.1, 587 p.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analytica-EBC. 5<sup>th</sup>.ed. Zurique: Brauerei-und Getränke – Rundschau, 2000. 271p.

HOUGH, J.S. Biotechnology of malting and brewing. Cambridge: Cambridge University Press, p.159, 1985.

Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. “*Declaración de Protección a la Denominación de Origen Sotol* ”. En el Diario Oficial de la Federación. 2 de agosto del 2002. P áginas 95-98.

López Barbosa, L. A. y L. Portes Vargas. “*El sotol, una planta muy especial. Manual del productor*”. Proyecto Integral del Sotol. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Secretaria de Fomento Agropecuario. Noviembre 2002.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 31, 426-428.

MUNROE, J.H. Aging and Finishing. In: HARDWICK, W.A. *Handbook of Brewing*. New York: Marcel Dekker, 1994b. p.355-379.

MUNROE, J.H. Fermentation. In: HARDWICK, W.A. *Handbook of Brewing*: New York: Marcel Dekker, 1994a. p.323-353.

Producción del sotol. Disponible en <http://www.vinomex.com.mx/produccion.htm>

REINOLD, M.R. *Manual práctico de cervejaría*. São Paulo: Aden, 1997. 214p.

RUSSELL, I.; STEWART, G.G. *Brewing*. In: REHM, H.J.; REED, G. ed. *Biotechnology*. New York: VCH, v.9, cap.11, 1995.

Sotol (*Dasyliirion Wheeleri*). Disponible en [www.saguaro-juniper.com/.../agaves&yuccas.html](http://www.saguaro-juniper.com/.../agaves&yuccas.html)

STEWART, G.G. A Brewer's Delight. *Chemistry and Industry*, p.706-709, nov, 2000.

TSCHOPE, E.C. *Microcervejarias e Cervejarias. A História, a Arte e a Tecnologia*. São Paulo: Editora Aden, 2001. p. 223.