



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Rafael Dourado Almeida

**VIABILIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PITANGA
(*Eugenia uniflora* L.) E MEL DE CUIPIRA (*Partamona* sp) COLETADOS NA
REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

**JOÃO PESSOA
2017**

RAFAEL DOURADO ALMEIDA

**VIABILIDADE DE FERMENTAÇÃO DE LEVEDURAS ISOLADAS DE PITANGA
(*Eugenia uniflora* L.) E MEL DE CUIPIRA (*Partamona* sp) COLETADOS NA
REGIÃO NORDESTE DO BRASIL**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de curso, do Curso de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba - UFPB, como requisito para a obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire.

Coorientador: Prof^a. Dr^a Adna Cristina Barbosa de Sousa

**JOÃO PESSOA/PB
2017**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

A447v Almeida, Rafael Dourado.

Viabilidade de fermentação de leveduras isoladas de pitanga (*Eugenia uniflora* L) e mel de cupira (*Partamona* sp) coletados na região nordeste do Brasil / Rafael Dourado Almeida. - João Pessoa, 2017.

46 f. : il.

Orientação: Kristerson Reinaldo de Luna Freire.

Coorientação: Adna Cristina Barbosa de Sousa.

Monografia (Graduação) - UFPB/CBIOTEC.

1. Leveduras selvagens. 2. *Eugenia uniflora* L. 3. *Partamona* sp. I. Freire, Kristerson Reinaldo de Luna. II. Sousa, Adna Cristina Barbosa de. III. Título.

UFPB/BC



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos vinte e quatro dias do mês de novembro de 2017, às 10:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pelo Professor Kristerson Reinaldo de Luna Freire e composta pelos avaliadores 1. Profa. Dra. Gisely Maria Freire Abilio (CCS/UFPB); 2. Prof. Dr. Marcelo Barbosa Muniz (DEA/CT/UFPB), o discente Rafael Dourado Almeida, matrícula 11322840, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Viabilidade de fermentação de leveduras isoladas de pitanga (*Eugenia uniflora*) e mel de Cupira (*Partamona sp*) coletados na região nordeste do Brasil**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela APROVAÇÃO do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao discente e demais presentes e eu, Kristerson Reinaldo de Luna Freire, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pelo discente.


Presidente da Banca Examinadora


Avaliador 1


Discente


Avaliador 2

Dedico este trabalho à minha família e amigos
por todo apoio, incentivo e cooperação durante
toda minha graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Mariana Dourado e Eugênio Diniz por proporcionarem os melhores estudos que me permitiram ingressar em uma Universidade Federal, e por ter o estudo como única atividade durante toda minha graduação. Agradeço-os também pelos conselhos e ensinamentos ao longo da vida, pelos incentivos as minhas escolhas e por toda a paciência em me amparar nos momentos de angústia.

Ao meu irmão Pedro Dourado por estar presente durante toda a minha graduação.

À minha prima Gabriela Almeida por ser a melhor confidente e ouvinte das angústias ao longo do curso.

Aos meus avós, tios e primos que me incentivam todos os dias a ser uma pessoa melhor.

Aos meus amigos Rafael Ventura, Luana Santiago, Caroline Botelho e Eduardo Gonzalez pelo incansável apoio durante todo o trabalho.

Às minhas amigas Paloma Silva e Júlia Ondrusch por terem sido ótimas companheiras de sala durante toda minha graduação.

Às minhas amigas Tatiana Valença, Rhaila Cortes e Kiane Mabel por todas as boas energias emanadas ao longo desse projeto. Por acreditarem na finalização dele e no meu potencial.

À Leonardo Araújo por me acolher nos momentos de dificuldade e garantir que eu estivesse sempre o melhor possível ao longo da execução deste trabalho.

Aos meus professores do Centro de Biotecnologia da UFPB, que foram fundamentais para minha formação profissional, em especial ao professor Ulrich Vasconcelos que me orientou por dois anos em projetos de iniciação científica e proporcionou oportunidades únicas ao longo da minha graduação.

À Ícaro Alves e Karen Pequeno pelo auxílio ao longo dos experimentos e por acreditarem na conclusão desse trabalho.

Aos meus orientadores Kristerson Freire e Adna Sousa pela oportunidade de executar um projeto do meu interesse, disponibilizando todas as condições

necessárias para a executá-lo, por toda paciência com os percalços encontrados ao longo desse trabalho e pela total disponibilidade para tirar dúvidas e garantir que o conhecimento tenha sido passado de forma compreensível.

Obrigado.

“Em ciência não existe um erro tão grosseiro que, amanhã ou depois, sob alguma perspectiva, não pareça profético.”

(Jean Rostand)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Entrada da colônia de abelha cupira construída com barro.	21
Figura 2: Fluxograma do preparo do mosto cervejeiro	22
Figura 3: Mosto cervejeiro inoculado com a amostra de pitanga sobre placa agitadora para isolamento da levedura.	24
Figura 4: Mosto cervejeiro inoculado com amostra de mel de cupira sobre placa agitadora para isolamento da levedura.	25
Figura 5: Comparativo entre o primeiro dia (1) e o sétimo dia (2) de fermentação com a amostra de pitanga.....	25
Figura 6: Placas de petri obtidas após 5 dias de encubação	27
Figura 7: Microfotografia da levedura isolada do mel de cupira	34
Figura 8: Microfotografia da levedura isolada da pitanga.....	35
Figura 9: Alteração de pH ao longo da fermentação	36
Figura 10: Quantificação de células/mL ao longo da fermentação.....	37
Figura 11: Alteração de temperatura em relação aos pontos de coleta	37
Figura 12: Relação Temperatura x Células/mL x10 ⁹	38
Figura 13: Viabilidade celular em %	39
Figura 14: Atenuação do mosto cervejeiro	41
Figura 15: Atenuação em porcentagem das amostras	42

GLOSSÁRIO

Diastático – qualidade de conjunto de enzimas presentes no malte que converte amido em maltose.

Flavour – combinação de odor e sabor.

Lager – tipo de cerveja fermentada e armazenada em baixas temperaturas.

Malte - produto da malteação, grão germinado utilizado na fermentação.

Mosto -mistura açucarada destinada a fermentação alcoólica.

Pilsen - tipo de cerveja lager.

Session – cerveja com baixo teor alcoólico.

Substrato – meio nutriente para o desenvolvimento de um organismo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1	CERVEJA	17
3.1.1	Histórico	17
3.1.2	Composição	18
3.1.3	Agentes de Fermentação	18
3.2	PITANGA (<i>EUGENIA UNIFLORA</i> L.)	19
3.3	MEL DE CUIPIRA (<i>PARTAMONA</i> SP)	20
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	MATERIAIS PARA PREPARO DO MOSTO	22
4.2	PREPARO DO MOSTO CERVEJEIRO	22
4.3	COLETA DAS AMOSTRAS	23
4.3.1	Pitanga	23
4.3.2	Mel de cupira	23
4.4	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	23
4.4.1	Fermentação das amostras	24
4.4.2	Meio de cultura	26
4.4.3	Plaqueamento, isolamento e seleção	27
4.4.4	Cultura em lamínula	28
4.5	PROPAGAÇÃO E PREPARAÇÃO DO INÓCULO	28
4.6	PRODUÇÃO DA CERVEJA	28
4.7	ANÁLISE FERMENTATIVA	29
4.7.1	pH	29
4.7.2	Contagem de células	29
4.7.3	Consumo de substrato	30
4.7.4	Teor alcoólico	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1	ISOLAMENTO DAS LEVEDURAS	32
5.2	AValiação DOS PARÂMETROS FERMENTATIVOS	35
5.2.1	pH	35
5.2.2	Contagem de células	36
5.2.3	Viabilidade Celular	38
5.2.4	Consumo de substrato	39
5.2.5	Produção de etanol	42
6	CONCLUSÕES	43
	REFERÊNCIAS	44

RESUMO

A cerveja é considerada uma das bebidas mais antigas da história e atualmente é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Antigamente, a produção de cerveja era uma prática de herança familiar que consistia na reutilização de resíduos de uma batelada para iniciar a seguinte, dando origem ao processo de domesticação das leveduras. Este trabalho teve o intuito de avaliar a viabilidade da fermentação do mosto cervejeiro utilizando leveduras isoladas de amostras de pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e mel de cupira (*Partamona* sp), avaliando parâmetros de pH, concentração celular, viabilidade celular, consumo de substrato e teor alcoólico. O isolamento das leveduras foi feito a partir do crescimento microbiológico das amostras em mosto cervejeiro sob agitação por 7 dias, seguido de plaqueamento até obter-se uma cultura pura. A fermentação foi conduzida com temperaturas de 19 °C, 25 °C e temperatura ambiente (29 °C – 30 °C). Os produtos finais de ambas as amostras apresentaram pH similar a cervejas produzidas utilizando leveduras comerciais. A concentração celular da amostra de pitanga apresentou nos pontos iniciais resultados imensuráveis por ausência de células, porém com crescimento ótimo após aumento da temperatura. A atenuação aparente de ambas as amostras ocorreu de forma lenta, porém com resultado final atingindo 1,011 g/cm³ para a amostra de mel e 1,007 g/cm³ para a amostra de pitanga. O teor alcoólico nas cervejas foi de 3,2% para a amostra de mel e 3,85% para a amostra de pitanga, onde ambas se encaixam nos padrões estabelecidos pelo órgão regulador brasileiro ANVISA e de acordo com o *Beer Judge Certification Program* (BJCP), recebem a classificação de *Session*. A amostra de pitanga apresentou aromas frutados, suaves e de frutas vermelhas, mas com *off-flavour* semelhante a esparadrapo ou Band-aid, característico de leveduras selvagens. A amostra do mel apresentou aromas mais adocicado, semelhantes a mel e frutados, que remeteu ao caju, com o mesmo *off-flavour* da amostra anterior, porém em menor intensidade. Os resultados encontrados mostram que apesar dos *off-flavours* encontrados no produto final, o isolamento de leveduras selvagens é viável e passível de otimização, utilizando bateladas repetidas para domesticação desses microrganismos para o melhoramento dos padrões sensoriais e cinéticos.

Palavras-chave: Leveduras selvagens; *Eugenia uniflora* L.; mel de cupira; *Partamona* sp; domesticação de leveduras.

ABSTRACT

Beer is considered one of the oldest drinks in history and is currently one of the most consumed beverages in the world. In the past, brewing was a family heritage practice which consisted in the reuse of waste from one batch to start the next, originating the process of domestication of yeasts. The objective of this work was to evaluate the viability of brewer's yeast fermentation using yeasts isolated from pitanga (*Eugenia uniflora* L.) and cupira honey (*Partamona* sp), evaluating parameters of pH, cell concentration, cell viability, substrate consumption and alcoholic content. Isolation of the yeasts was made from the microbiological growth of the samples in brewing wort under agitation for 7 days, followed by plating until a pure culture was obtained. The fermentation was conducted with temperatures of 19 °C, 25 °C and room temperature (29 °C – 30 °C). The final products of both samples had similar pH to those from beers produced using commercial yeasts. The cell concentration of the pitanga sample initially presented immeasurable results due to the absence of cells, but it showed optimum growth after temperature increase. The apparent attenuation of both samples occurred slowly but with a final result reaching 1.011 g/cm³ for the honey sample and 1.007 g/cm³ for the cherry sample. The alcohol content in the beers was 3.2% for the honey sample and 3.85% for the pitanga sample, both of which fit the standards established by the Brazilian regulatory body ANVISA and according to the Beer Judge Certification Program (BJCP), receive the Session classification. The pitanga sample showed fruity aromas, soft and red fruits, but with off-flavor similar to tape or Band-aid, characteristic of wild yeasts. The honey sample had sweeter, honey-like and fruity aromas, which returned to the cashew, with the same off-flavor of the previous sample, but to a lesser extent. The results show that, despite the off-flavors found in the final product, the isolation of wild yeasts is feasible and optimizable, using repeated batchings to domestication of these microorganisms for the improvement of the sensory and kinetic patterns.

Key words: Wild yeasts; *Eugenia uniflora*; cupira honey; domestication of yeasts.

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida alcoólica que é obtida do processo de fermentação por leveduras do mosto que contém malte de cevada, água e lúpulo. Além disso, diferentes tipos de bebida podem ser fabricados caso o malte seja substituído por outros tipos de cereais, que sejam maltados ou não (REHM e REED, 1983; TSCHOPE, 2001). É uma bebida de ampla produção e consumo no mundo e chegou ao Brasil em 1808, trazida pela família real portuguesa de mudança para o então Brasil colônia. Com a abertura dos portos às nações amigas de Portugal, a Inglaterra foi a primeira a introduzir a cerveja na antiga colônia (MEGA, NEVES; ANDRADE, 2011).

A história da fermentação tem uma relação íntima com a utilização de microrganismos encontrados na natureza, a partir da fermentação espontânea como a primeira forma de fermentação descoberta. Relatos de diversos historiadores apresentam que a produção de bebidas fermentadas foi um dos fatores que levaram as pessoas da época a mudarem seus hábitos de caçadores e coletores para agricultores (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). A prática de produzir cerveja se tornou uma herança familiar, e a reutilização do resíduo de uma batelada para iniciar a outra se tornou uma prática comum, dando início à domesticação de leveduras, mesmo sem ter o conhecimento exato sobre o microrganismo.

A presença de leveduras em um ambiente, normalmente está relacionada à presença de fontes de açúcar, sendo a superfície de frutas, grãos de cereais, folhas e flores excelentes locais para encontrar pequenas populações de *Saccharomyces* (MATIENZO, 2002; SOUZA, 1969; TIKKA et al., 2013; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Segundo o Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009 que regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, “cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. Parte do malte da cevada pode ser substituída por adjuntos (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. (BRASIL, 1997)

A crescente competitividade do mercado, a introdução de novos produtos e diminuição nos custos, tem servido como motivação para inovações tecnológicas na produção cervejeira, e dentre essas inovações está a busca por novos microrganismos fermentativos que possuam características de *flavour* favoráveis para a indústria. -

Mediante o exposto, o intuito do presente trabalho isolar leveduras fermentativas do mel de cupira (*Partamona* sp) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e promover a fermentação em mosto cervejeiro a fim de avaliar o potencial para utilização na produção de cervejas artesanais

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Isolar leveduras fermentativas do mel de cupira (*Partamona sp*) e pitanga (*Eugenia uniflora*) e promover a fermentação em mosto cervejeiro a fim de avaliar o potencial para utilização na produção de cervejas artesanais.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar, propagar e isolar microrganismos presentes no mel de cupira (*Partamona sp*) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.);
- Caracterizar micro e macroscopicamente os microrganismos isolados
- Avaliar aspectos físico-químicos e parâmetros da fermentação dos microrganismos leveduriformes em mosto cervejeiro ao longo da fermentação e no produto final.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Cerveja

3.1.1 Histórico

A cerveja é uma bebida alcoólica que é obtida do processo de fermentação por leveduras do mosto que contém malte de cevada, água e lúpulo. Além disso, diferentes tipos de bebida podem ser fabricados caso o malte seja substituído por outros tipos de cereais, que sejam maltados ou não (REHM e REED, 1983; TSCHOPE, 2001).

Devido às diferentes formas de alteração das matérias-primas na hora de sua confecção, é difícil estipular o número de total de tipos de cerveja. Mudanças pequenas em seus ingredientes base, ou alterações no tempo de fermentação, temperaturas e tempos de mostura faz com que vários de tipos de bebidas surjam.

Há relatos que indicam que a cerveja é uma das bebidas mais antigas na história, com ocorrências no Egito e Mesopotâmia há mais de 5 mil anos, que são civilizações que se destacam por ter uma grande produção de cereais. Já na Europa, Grécia e Roma foram as pioneiras, deixando de ser apenas produtoras de vinho. O povo germânico também se destacou na confecção de cervejas. O começo da produção cervejeira no Brasil se mostrou tardia, devido ao clima impróprio para cultivo de cevada e lúpulo, além da tradição de consumo de vinho herdada dos colonizadores portugueses. A primeira cervejaria brasileira é a Bohemia, porém a produção industrial se estabeleceu com a Cerveja Brahma Villiger & Companhia, em 1888, no Rio de Janeiro (AQUARONE et al., 2001).

Atualmente, o Brasil tem um grande papel no mercado cervejeiro mundial, tendo a maior empresa no ramo, a AB Inbev, que é composta da fusão de diversas empresas como a Brahma, a Antarctica, a Interbrew e a Anheuser-Busch (produtora da Budweiser). Com isso, os grupos cervejeiros AB Inbev, SAB Miller, Heineken, Carlsberg e China Resource Brewery têm controle de 50% do mercado mundial de cervejas (CERVESIA, 2008).

3.1.2 Composição

As matérias primas básicas na produção do mosto de cerveja são água, lúpulo e cevada. A qualidade destes tem um impacto direto no produto final.

No processo, existem requisitos, fora a potabilidade, que a água utilizada deve seguir, pois estes influenciam no brilho, na espuma, no aroma e sabor da bebida. Portanto, a água deve ser incolor, inodora, insípida e isenta de turbidez, além de apresentar uma pequena carga microbiana e baixa concentração de gases dissolvidos (DRAGONE e SILVA, 2010).

A cevada é o cereal preferencial para a produção da cerveja, embora outro também possam ser utilizados na sua confecção. Devido à sua preferência, cerca de 94% da produção de cevada no ano 2000 foi destinada à produção cervejeira. (MORRIS, BRYCE, 2000; LEWIS, YOUNG, 2001). O malte de cevada é obtido a partir do processo de malteação, necessário para que haja um aumento no conteúdo enzimático do cereal e do poder diastático dele. Esta propriedade faz com que o amido presente seja hidrolisado disponibilizando açúcares fermentescíveis (LIMA et al, 2001; O'ROURKE, 2002).

O lúpulo é uma planta de difícil cultivo, devido à sua necessidade de clima frio, regas frequentes, luz intensa, pouco vento, solo profundo e pouco compactado e sua sujeição a pragas e doenças. Desta planta são utilizadas as inflorescências femininas não fecundadas como matéria-prima, pois contêm a lupulina intacta, em que se concentram resinas amargas, óleos essenciais e polifenóis. Estes elementos contidos no lúpulo, com a presença de minerais, se tornam essenciais na produção da bebida, conferindo aroma, sabor e amargor (KUNZE, 1999; DRAGONE e SILVA, 2010).

Há também a existência de adjuntos, que podem ser definidos como substâncias capazes de fornecer uma quantidade suficiente de carboidratos ao mosto, com o intuito de complementar o teor obtido do malte da cevada. Normalmente, são utilizados amiláceos, açúcares e extratos (BRIGGS et al, 2004).

Por fim, existem também aditivos, que são elementos que, se adicionados em pequenas quantidades, podem ter efeitos desejáveis no produto final. Enzimas, agentes filtrantes e clarificantes e antioxidantes são alguns exemplos.

3.1.3 Agentes de Fermentação

Embora existam diversos microrganismos que possuam a habilidade de produzir etanol metabolicamente, as leveduras são as mais utilizadas, destacando-se as do gênero *Saccharomyces*, visto sua grande utilização na produção de alimentos e bebidas. As leveduras cervejeiras (*S. cerevisiae* e *S. uvarum*) são seres aeróbicos facultativos que conseguem realizar a aerobiose em presença de oxigênio, e, em sua ausência, praticam o processo fermentativo. Neste processo, elas metabolizam açúcares simples e liberam metabólitos essenciais como CO₂ e etanol (PRESCOTT e DUNN, 1949; BOULTON e QUAIN, 2001; TORTORA, CASE E FUNKE, 2011).

As leveduras cervejeiras são associadas a dois tipos distintos de cerveja. As leveduras da espécie *S. cerevisiae* são associadas ao tipo Ale e apresentam atividade ótima entre as temperaturas 18 e 22 °C, e são as chamadas leveduras de alta fermentação, visto que formam pseudo-hifas e sofrem flotação por arraste de CO₂ (DRAGONE e SILVA, 2010; BAMFORTH, 2003; BOULTON e QUAIN, 2001). As leveduras da espécie *S. uvarum* possuem uma atividade melhor nas temperaturas de 6 e 15°C e possuem o processo de floculação, principalmente quando a fonte de açúcar a ser fermentado se extingue. Devido a esse processo, os flocos se depositam no fundo do reator, denominando, então, as leveduras de baixa fermentação, que são associadas a cerveja do tipo Lager (BOULTON e QUAIN, 2001; DRAGONE e SILVA, 2010; BAMFORTH, 2003).

3.2 Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)

A pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), é uma planta arbustiva frutífera nativa do Brasil que pertence à família *Myrtaceae* e é explorada devido aos efeitos medicinais de suas folhas, cuja infusão é utilizada de forma anti-hipertensiva e anti-reumática (AURICCHIO, 2006). Além disso, seus frutos são utilizados no preparo de polpas, sucos, licores, vinhos, etc (BEZERRA, 2004).

A pitanga é uma fruta que tem uma grande adaptabilidade a diferentes condições climáticas e territoriais e, por isso, é encontrada em diferentes países e continentes. No Brasil, ela pode ser encontrada desde o Estado do Amazonas até o Rio Grande do Sul. O fruto em si é uma baga globosa, que tem de 7 a 10 sulcos longitudinais, que possui sépalas persistentes, além de ter um aroma característico e sabor doce e ácido (BEZERRA, 2000).

O fruto também demonstra ter alta atividade microbiana contra *Escherichia coli*, *Streptococcus pyogenes*, *Providencia spp.*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus spp.*(VIZZOTTO, 2006).

3.3 Mel de cupira (*Partamona sp*)

O mel de cupira é uma variedade de mel produzido pela abelha *Partamona seridoenses*, que é uma espécie de abelha sem-ferrão, pois apresenta o ferrão atrofiado, que é eusocial e existe em grande parte das regiões tropicais e subtropicais no hemisfério sul. Ela faz parte da família *Apidae* e é classificada na tribo *Meliponini* (BARBOSA et al., 2016).

A colmeia dessas abelhas é montada sobre cavidades pré-existentes, em árvores ou subterrâneas, e tem a entrada na forma de uma pequena abertura com espaço para uma apenas uma abelha, ou um tubo (ROSA et al., 2003).

O mel produzido por esse gênero de abelhas é composto basicamente por água, açúcares redutores (glicose e frutose) e açúcares não-redutores (sacarose e maltose), sendo que as proporções variam com diversos fatores, como temperatura, localização e origem do pólen, mesmo dentro da mesma espécie. Maturidade do ninho, fatores geográficos ou climáticos são algumas das variáveis que influenciam o processo de produção do mel (VIT et al, 2013). A Figura 1, apresentada abaixo, representa a entrada da colônia de abelha cupira construída em barro.

FIGURA 1: Entrada da colônia de abelha cupira construída com barro.



Fonte: VILLAS-BÔAS et al., 2012

Devido a sua composição, o mel tem a tendência a ser um ambiente inóspito para o desenvolvimento de microrganismos. Isso ocorre por alguns fatores, como a alta concentração de açúcar e presença de peróxido de hidrogênio, lisozima e ácidos fenólicos. Entretanto, ainda é possível observar a atividade microbiana no mel. Devido à alta umidade no mel da tribo *Melipolini*, a presença de leveduras é muito mais impactante, pois elas são ligadas a processos fermentativos (SOUZA, 2010).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

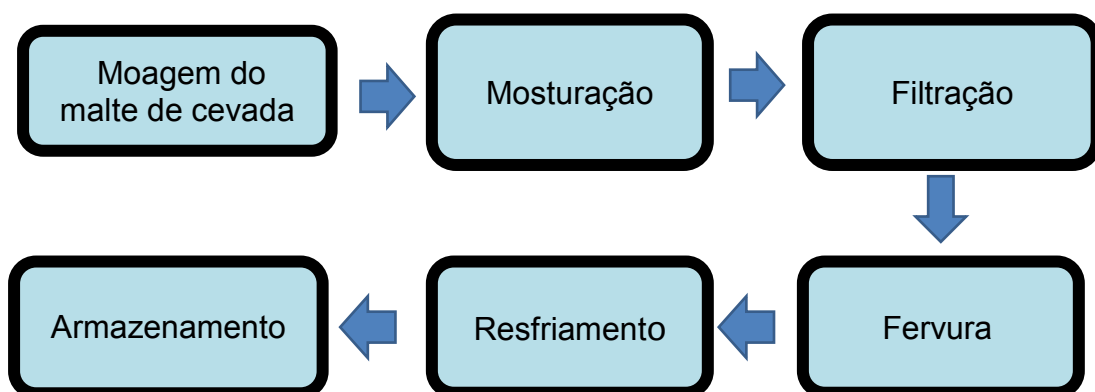
4.1 Materiais para preparo do mosto

As matérias-primas utilizadas na fabricação da cerveja foram: água potável filtrada, declorada e acidificada com solução de ácido fosfórico 10%, malte de cevada, extrato de lúpulo HopAlpha Tetra, adquiridos em lojas especializadas pela internet. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Química Orgânica Aplicada e no Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia Vegetal, ambos do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB.

4.2 Preparo do mosto cervejeiro

O preparo do mosto cervejeiro está descrito no fluxograma a seguir (Figura 2).

Figura 2: Fluxograma do preparo do mosto cervejeiro



Fonte: Autor

A etapa de moagem do malte de cevada foi conduzida em moinho de dois rolos (MonsterMill®), com abertura de 0,8 mm; a etapa de mosturação foi realizada em três paradas: a primeira a 64 °C por 60 minutos para atuação da enzima beta-amilase; a segunda a 69 °C por 20 minutos, com rampa de 5 minutos, para atuação

da enzima alfa-amilase e a terceira a 76 °C por 1 minuto, com rampa de 8 minutos para inativação enzimática. O consumo de amido foi verificado pelo reagente iodo 0,02 N. Após a mosturação, o mosto foi recirculado e filtrado, em tina de clarificação com fundo falso, onde a própria palha do malte fez o papel de filtro, até completar a clarificação. (KUNZE, 1999)

O mosto clarificado foi transferido para a tina de fervura, e o resíduo da mosturação foi lavado com água filtrada, pré-aquecida (76°C) e com pH controlado (5,5), até que o líquido filtrado saísse da tina de clarificação na densidade específica de 1,010g/cm³. Após atingir fervura, o mosto permaneceu fervente durante 60 minutos para garantir esterilização, e foi resfriado utilizando-se um *chiller* de imersão com circulação de água gelada, até a temperatura de 15 °C. Após isso, o mosto foi fracionado em recipientes e armazenado em freezer com temperatura de -18° C.

Foram preparados 20L de mosto para garantir que seria utilizado o mesmo mosto em todas as etapas do trabalho.

4.3 Coleta das amostras

4.3.1 Pitanga

Os frutos de pitanga foram coletados na cidade de Bayeux, Paraíba, em 2017, diretamente da árvore, de forma asséptica, utilizando luvas e armazenados em recipientes fechados. Foram selecionados majoritariamente frutos maduros com fissuras nas cascas.

4.3.2 Mel de cupira

O mel de cupira utilizado nos experimentos foi coletado no sítio Juá, em 2017, na cidade de Remanso na Bahia, pela Profa. Dra. Eva Mônica Sarnento da Silva, do Laboratório de Apicultura e Meliponicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), armazenado refrigerado em tubo tipo Falcon de 50 mL.

4.4 Isolamento das leveduras

4.4.1 Fermentação das amostras

Inicialmente foram preparadas as soluções de inoculação, adicionando 200 mL de mosto cervejeiro descongelado, e uma barra agitadora magnética, em erlenmeyers de 1000 mL, submetidas à fervura por 15 minutos e resfriados em banho de gelo a 30 °C. As amostras de mel (50 mL) e pitanga (50 g) foram adicionadas separadamente em cada Erlenmeyer e as amostras foram mantidas sob agitação magnética com agitação suficiente para formação de vortex, por 7 dias a temperatura ambiente (DIRKSEN, 2017).

A Figura 3 e a Figura 4 apresentam as amostras de pitanga e mel de cupira, respectivamente, sobre agitadores magnéticos. A Figura 5 apresenta o comparativo da amostra de pitanga entre o primeiro dia e o sétimo dia.

Figura 3: Mosto cervejeiro inoculado com a amostra de pitanga sobre placa agitadora para isolamento da levedura.



Fonte: Autor

Figura 4: Mosto cervejeiro inoculado com amostra de mel de cupira sobre placa agitadora para isolamento da levedura.



Figura 5: Comparativo entre o primeiro dia (1) e o sétimo dia (2) de fermentação com a amostra de pitanga.

Fonte: Autor

Fonte: Autor

4.4.2 Meio de cultura

Foi utilizado o meio Ágar-Sauboraud-dextrose, com pH ajustado para 5,6. A composição do meio está descrita na Tabela 1.

Tabela 1: Composição do meio Ágar-Sauboraud-dextrose

Componente	Concentração(g/L)
Ágar	20
Dextrose	40



Peptona

10

Fonte: Autor

4.4.3 Plaqueamento, isolamento e seleção

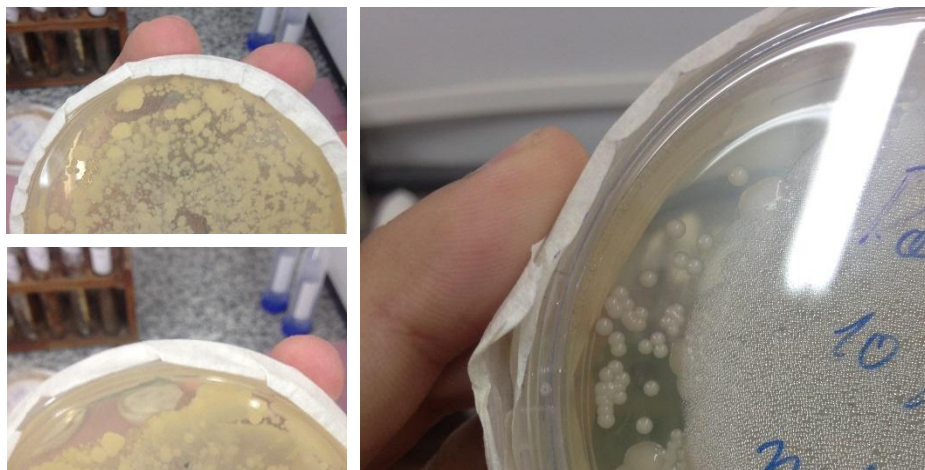
Após a fermentação, foi retirada uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra, diluída em 50 mL de água destilada estéril e utilizada uma gota da diluição para efetuar o espalhamento sobre a placa de petri contendo meio de cultura estéril. A diluição foi feita com a finalidade de diminuir a concentração dos microrganismos a fim de facilitar o isolamento. O experimento foi executado em triplicata.

As placas ficaram encubadas em temperatura ambiente de aproximadamente 29°C por 5 dias ou até apresentarem crescimento microbiológico suficiente para isolamento.

Após o crescimento, foram selecionadas colônias com aparência morfológica distintas entre elas (tipo de borda, volume da colônia, brilho) e que não estivessem em contato com outras colônias para evitar a contaminação e com o auxílio de uma alça de platina foram transferidas para uma nova placa para crescimento. O procedimento foi executado em triplicata.

A Figura 6 apresenta placas com o crescimento microbiológico a partir do espalhamento das amostras fermentadas.

Figura 6: Placas de petri obtidas após 5 dias de encubação



Fonte: Autor

4.4.4 Cultura em lamínula

Fragmentos da colônia foram colocados estrategicamente sobre o meio de cultura ágar-Sabouraud-dextrose contidos em placas de Petri, e coberto com uma lamínula previamente flambada. Após o crescimento, a cada 24 horas, as lamínulas foram retiradas e colocadas invertidas sobre uma lâmina contendo o corante azul de metil e observada ao microscópio óptico. As lamínulas foram avaliadas no período de 24 a 96 horas a fim de visualizar estruturas micromorfológicas.

4.5 Propagação e preparação do inóculo

Para o preparo do inóculo foi necessário propagar a levedura da placa de Petri até um volume suficiente para obtenção da concentração ótima de células viáveis disponíveis para a fermentação. Com isso, foram preparados erlenmeyers contendo 50 mL de mosto cervejeiro previamente descongelado e fervido e inoculado duas alçadas da levedura isolada, deixando em crescimento sob agitação por 24 h, sendo esse o pré-inóculo. Após o crescimento, foram preparados novos erlenmeyers com 250 mL do mosto e inoculado todo o volume do pré-inóculo, totalizando um volume de 300 mL, deixando em crescimento sob agitação por 24 h. Após o crescimento, foi retirada uma pequena alíquota de cada amostra de inóculo e realizada uma contagem celular em câmara de Neubauer de acordo com White e Zainasheff (2010) para avaliar a concentração de célula/mL e a viabilidade celular.

4.6 Produção da cerveja

Foram descongelados 4 L do mosto, mantido a 0°C por dois dias, sendo o sobrenadante transferido para tina de fervura. Logo em seguida foram adicionadas 16 gotas de extrato de lúpulo HopAlpha Tetra visando atingir um amargor de 10 IBUs, sendo esta a quantidade mínima de amargor para uma cerveja leve e clara. O mosto foi mantido em fervura por 15 min para descontaminação, resfriado em banho de gelo até atingir a temperatura de 19 °C, transferido para os tanques de fermentação, para que fosse totalizado após inoculação o volume de 2 L por balde

fermentador. Foram utilizados baldes fermentadores contendo duas torneiras para retirada de amostra, acoplados com uma torneira para saída do gás produzido ao longo da fermentação, colocado em um recipiente contendo água para evitar entrada de oxigênio no balde fermentador.

Para o volume de 2L, são necessárias aproximadamente 20×10^9 de células viáveis e livres para a fermentação, portanto a partir do inóculo preparado previamente, foram realizadas contagens celulares e adicionados 110mL do inóculo da levedura originada do mel e 300 mL do inóculo da levedura originada da pitanga em fermentadores diferentes.

4.7 Análise fermentativa

4.7.1 pH

Foram coletados 10 ml das amostras às 8, 12 e 18 horas, durante 5 dias até que se completassem aproximadamente 102 h de fermentação e no produto final, 15 dias após o envase. Foi obtido por medição direta com uso de pHmetro de bancada, calibrada com solução tampão de pH 4,0 e 7,0 (IAL, 2008).

4.7.2 Contagem de células

A contagem do número de células totais e viáveis e da viabilidade celular foi realizada por contagem em hemocitômetro na configuração de Neubauer, utilizando-se corante azul de metileno (0,1%) para facilitar a visualização e diferenciação celular entre células vivas e mortas, e analisado em microscópio binocular (Tecnal-Coleman, modelo N107), com aumento final de 400 X. A contagem de células foi realizada no inóculo, duas vezes ao dia durante a fermentação e na cerveja pronta (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). O cálculo de células totais/mL foi feito utilizando a equação 1 da viabilidade celular é realizado segundo a equação 2.

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = n^{\circ} \text{ de cél contadas} \times 5 \times \text{Fator de diluição} \times 10^4 \quad (1)$$

$$Viabilidade (\%) = \frac{(n^{\circ} \text{ total de células} - n^{\circ} \text{ células mortas})}{(n^{\circ} \text{ total de células}) \times 100} \quad (2)$$

4.7.3 Consumo de substrato

Foram coletadas amostras às 8, 12 e 18 horas, durante 5 dias até que se completassem 102 h de fermentação, e no produto final, 15 dias após o envase, todas em duplicata. As medições foram realizadas utilizando-se um refratômetro previamente calibrado, e os resultados foram expressos em °Brix, que é uma escala numérica de refração utilizada para determinar a concentração de sólidos solúveis das amostras analisadas (IAL, 2008).

As medidas realizadas no refratômetro refletem a medida do extrato real, ou seja, são os sólidos solúveis mais o álcool etílico, sendo necessária posterior correção da leitura. Estes resultados podem ser convertidos em densidade específica (SG), expressos em g/cm³, através da equação 3.

$$SG = 1,000019 + SS(0,003878634261280) \quad (3)$$

Onde SS= sólidos solúveis medidos em °Brix (Sparre's Brewery, 2017).

4.7.4 Teor alcoólico

Foi utilizado o ebuliômetro para quantificar o teor de álcool em soluções mistas álcool-água, por meio da diferença entre as temperaturas de ebulição da água pura e da solução. Baseado nessa comparação foi possível determinar o percentual de álcool (v/v), com o auxílio de uma régua referencial (COSTA, 2010).

O equipamento conta com um condensador acoplado, assim como um termômetro para a medição de temperatura. Com o auxílio de uma lamparina, aqueceu-se a amostra e aguardou-se entre 3 e 5 minutos para que a temperatura ficasse estabilizada. A temperatura foi aferida e com o auxílio da régua de correção foi determinado o teor alcoólico do fermentado. Ao término de cada leitura, o termômetro foi removido e o ebuliômetro foi lavado com água destilada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Isolamento das leveduras

As amostras de mel de cupira (*Partamona* sp) e pitanga (*Eugenia uniflora* L.) foram fermentadas em mosto cervejeiro por sete dias, obtendo assim uma variedade de microrganismos, dentre eles bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

Após o crescimento em placa, foi observado a presença de colônias com diferentes aspectos morfológicos relacionados a cor (branco e branco-amarelado), forma da colônia (oval e elíptica), aspecto (superfície lisa e rugosa) e brilho (brilhante e opaca).

Foram selecionadas colônias com aspectos macromorfológicos similares as das colônias da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, e isoladas em novas placas de Petri contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose para que fossem avaliadas separadamente.

A Tabela 2 apresenta a lista de microrganismos isolados com suas características, sendo M a letra utilizada para os microrganismos isolados do substrato de mel de cupira e P para os microrganismos isolados da amostra de pitanga.

Tabela 2: Lista de microrganismos isolados

Classificação	Origem	Características da colônia
M1	Mel de cupira	Cor branca, brilhosa, superfície lisa
M2	Mel de cupira	Cor creme, opaca, superfície lisa
M3	Mel de cupira	Cor branca, opaca, superfície lisa
P1	Pitanga	Cor creme, opaca, superfície lisa
P2	Pitanga	Cor branca, brilhosa, superfície lisa
P3	Pitanga	Cor creme, opaca, superfície rugosa

Fonte: Autor

Dirksen (2017), em seu trabalho, utilizou de 30 dias para fermentar sua amostra de acerola (*Malphigia glabra*) também em mosto cervejeiro, o que resultou em uma maior variedade de microrganismos, isolando um total de 22 colônias, dentre eles organismos que só surgiriam com maior tempo de fermentação, como *Brettanomyces* sp. (FUGELSANG, 1997). Porém esse longo tempo de fermentação pode acarretar em uma redução da viabilidade dos microrganismos que crescem mais rápido, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que tem crescimento de aproximadamente 8 horas em meio complexo (SILVA, 1996), devido a toxicidade dos metabólitos produzidos ao longo da fermentação, como o álcool.

Já Heinz (2014), utilizou de duas metodologias distintas para isolamento de leveduras da amora-preta (*Rubus* sp.), sendo uma delas utilizando um extrato preparado da fruta diretamente aplicado em placa de Petri contendo meio ágar-Sabouraud-dextrose adicionado de clorofenicol, obtendo uma cultura mais limpa, com ausência de bactérias, mesmo não sendo um antibiótico de amplo espectro antimicrobiano. O segundo protocolo utilizado por Heinz (2014) submeteu a biomassa triturada da fruta à fermentação alcoólica por 48h, seguido de plaqueamento em meio idêntico ao primeiro protocolo e encubação em temperatura controlada. Porém a ausência do mosto cervejeiro não garante que os microrganismos presentes na fruta seriam capazes de consumir o principal açúcar disponível no mosto cervejeiro, a maltose (DIRKSEN, 2017).

Dirksen e Garcia (2017), em seu plaqueamento, utilizaram cicloheximida, um antifúngico que em concentrações de 10 mg.L⁻¹ (MORNEAU, 2011), se mostrou inibidor ao crescimento de leveduras cervejeiras do gênero *Saccharomyces*, apresentando eficiência no processo de seleção de bactérias. Utilizaram também outras metodologias para aumentar a eficiência de seleção dos microrganismos, como teste de produção de ácido para seleção negativa para leveduras do gênero *Saccharomyces*.

As colônias, após o isolamento, foram observadas em microscópio com ampliação final de 400X, pelo crescimento em lamínula, utilizando corante azul de metileno para uma melhor visualização, e com base nas características micromorfológicas mais próximas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, como presença de brotamento multilateral, células abauladas, redondas ou apiculadas e dimensão celular (PELCZAR JR; CHAN; KRIEG, 1996), foram selecionados os

microrganismos M1 e P1. Os microrganismos P2, P3 e M2 apresentaram formação de hifas e o microrganismo M3 apresentou tamanho celular incoerente com o tamanho de leveduras do gênero *Saccharomyces*. Apesar dos métodos de seleção utilizados, são necessários testes moleculares para a identificação correta do gênero e espécie das leveduras isoladas.

As Figuras 7 e 8 apresentam as leveduras selecionadas para a fermentação. As imagens foram coletadas a partir de lâminas preparadas utilizando amostras ao fim do processo fermentativo.

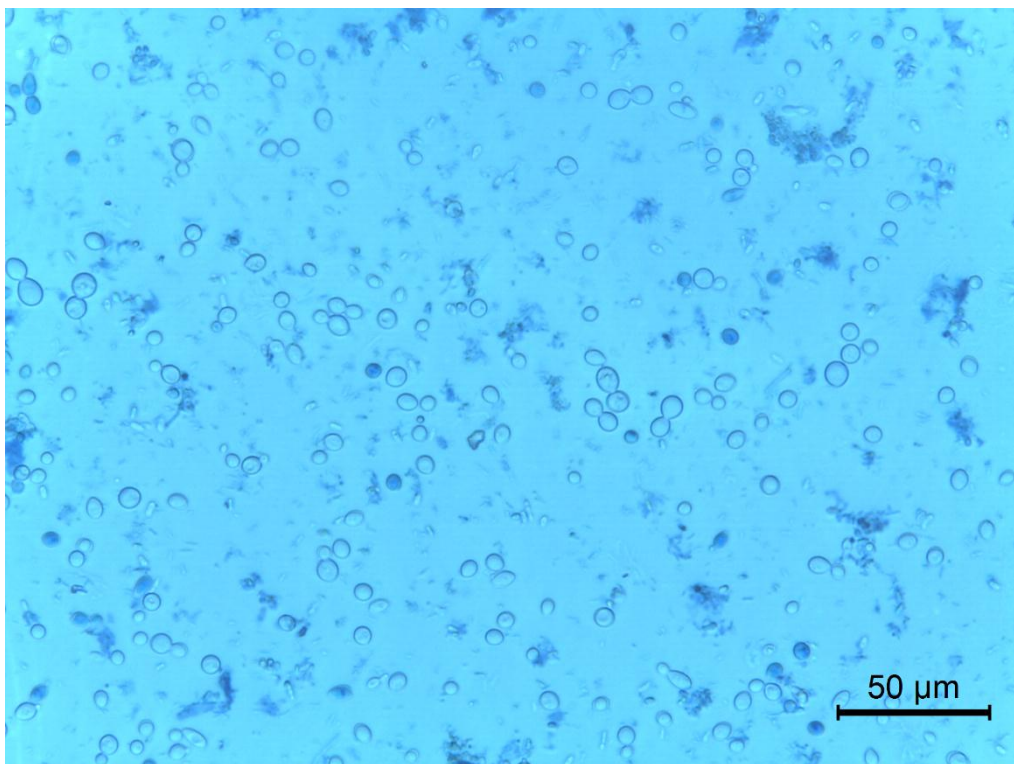


Figura 7: Microfotografia da levedura isolada do mel de cupira

Fonte: Autor

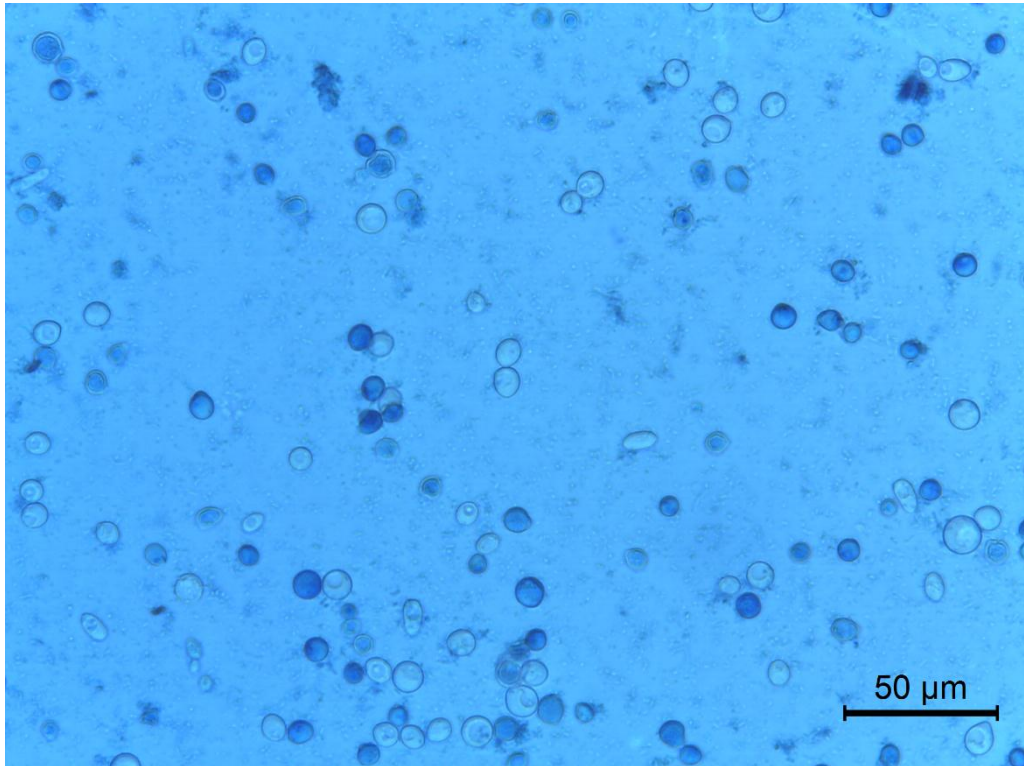


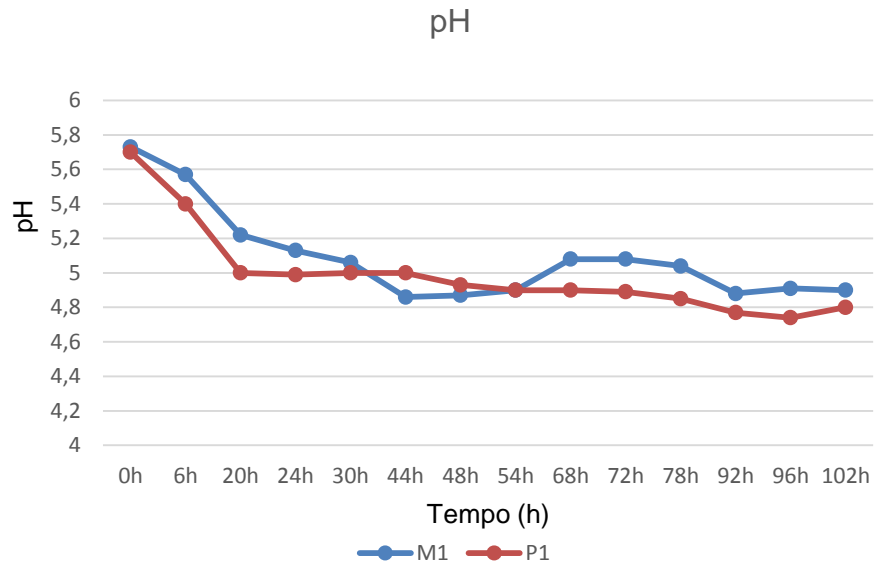
Figura 8: Microfotografia da levedura isolada da pitanga

Fonte: Autor

5.2 Avaliação dos parâmetros fermentativos

5.2.1 pH

De acordo com Araújo et al. (2003), a cerveja é um produto fermentativo levemente ácido, que quando produzida com malte clássico, apresenta pH de 4 a 5 e as do tipo ale com pH variando de 3 a 6 e, de acordo com Moreira (2005), o pH de três cervejas comerciais do tipo pilsen variou de 3,92 a 4,13, e Sleiman (2002), cita um pH próximo a 4,5 para cervejas de malte. Com isso, observando a Figura 9, pode-se observar que ambas as cervejas apresentaram resultados similares de pH a cervejas produzidas com leveduras comerciais ao fim da fermentação.

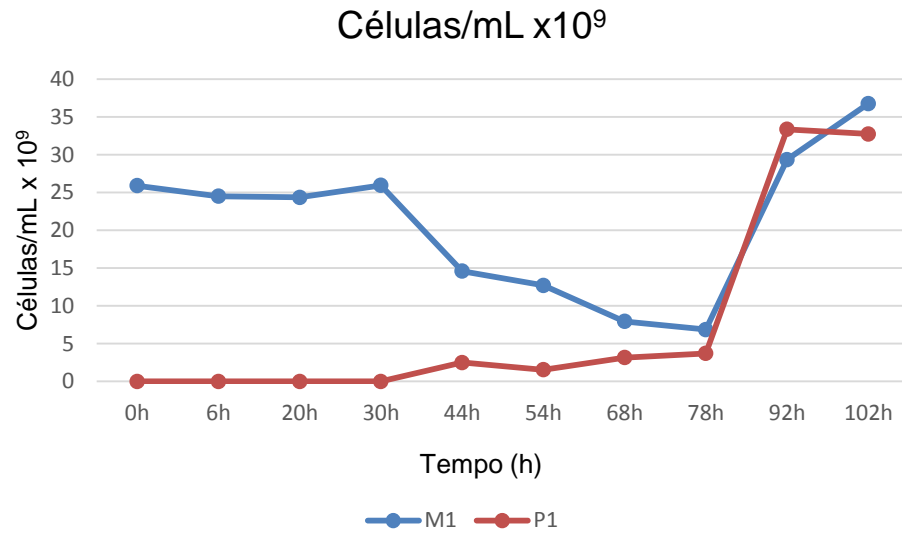
Figura 9: Alteração de pH ao longo da fermentação

Fonte: Autor

Na análise feita após o envase, os pH de ambas as amostras apresentaram valores menores, sendo para a amostra M1 3,97 e para a amostra P1 4,08, indicando uma possível produção de ácidos orgânicos na cerveja já envasada, levando a uma maior redução de pH. Os valores obtidos após o envase também se assemelham a cervejas produzidas com leveduras comerciais.

5.2.2 Contagem de células

A figura 10 apresenta os dados de contagem de células de ambas as amostras.

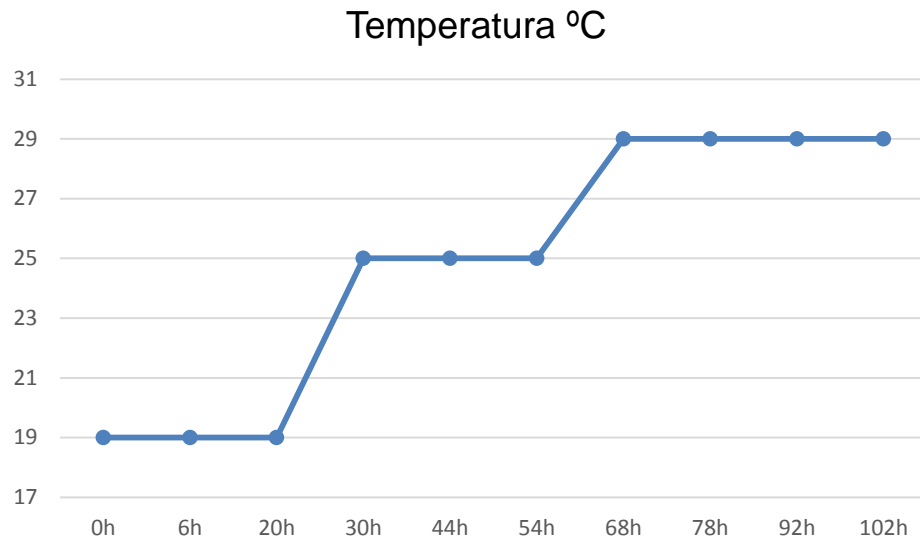
Figura 10: Quantificação de células/mL ao longo da fermentação

A quantificação de células da amostra M1 apresentou uma queda acentuada entre 30 e 78 horas, porém voltou a subir e apresentou o ápice de concentração no último ponto coletado com 102h. Essa alteração pode estar relacionada ao estresse gerado pela adaptação da levedura ao mosto cervejeiro. Em contrapartida, a quantificação celular da amostra P1 só foi possível ser contabilizada após a primeira alteração de temperatura da fermentação, podendo estar relacionada a não-adaptação das células inoculadas à uma baixa temperatura, ao mosto cervejeiro, às condições anaeróbicas ou ainda, a uma taxa de inoculação inadequada para as leveduras utilizadas.

A fermentação foi conduzida, nas primeiras 30 horas, na temperatura de 19 °C. Observando uma estagnação do consumo do substrato, decidiu-se subir a temperatura para 25 °C, no momento 30 horas. Mesmo assim, o consumo permaneceu estagnado até que no momento 68 horas decidiu-se deixar o fermentador a temperatura ambiente (29-30 °C).

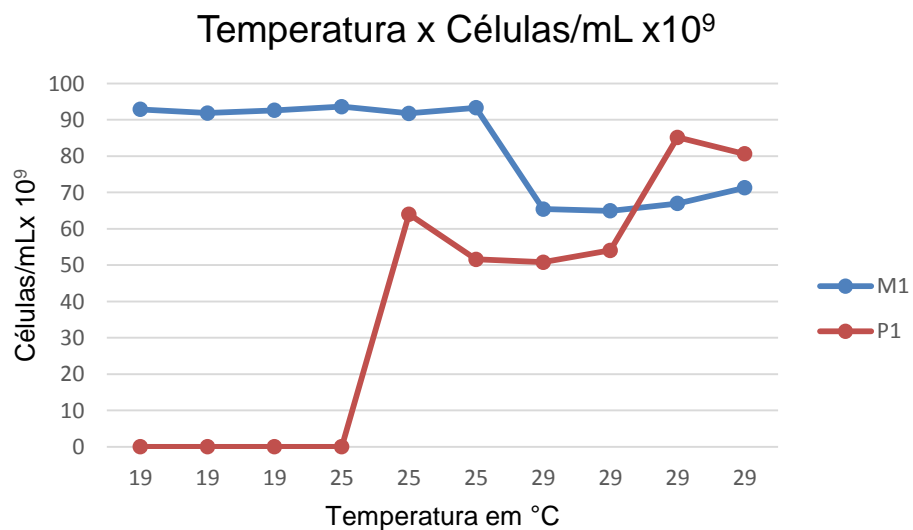
As Figura 11 e 12, mostradas abaixo, apresentam a alteração da temperatura ao longo dos pontos coletados e a quantificação celular das amostras em relação a temperatura do processo respectivamente. É possível observar o aumento do número de células totais com o aumento da temperatura para 29-30 °C.

Figura 11: Alteração de temperatura em relação aos pontos de coleta



Fonte: Autor

Figura 12: Relação Temperatura x Células/mL x10⁹



Fonte: Autor

5.2.3 Viabilidade Celular

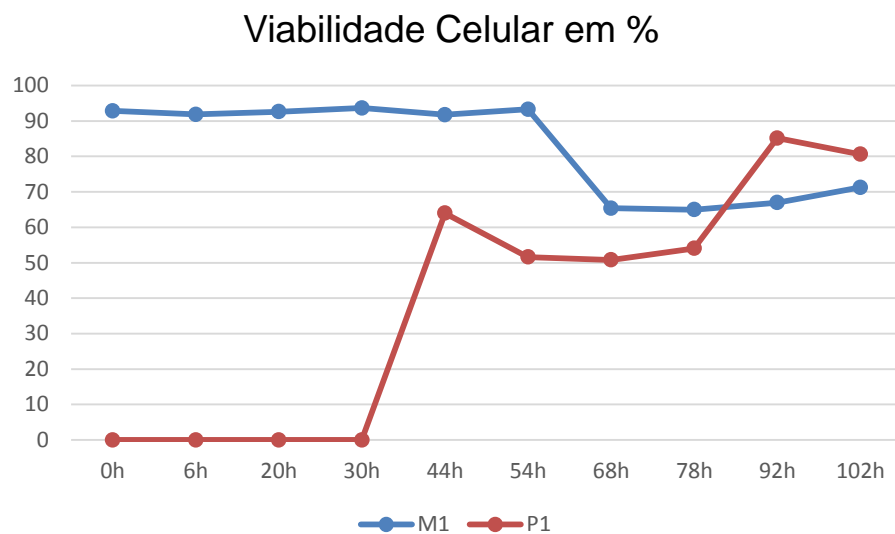
A viabilidade celular da amostra M1 apresentou uma queda entre o momento 54 horas e 68 horas. Essa diminuição na viabilidade celular pode estar relacionada ao fim do ciclo celular das células inoculadas, aumentando assim a quantificação de células mortas. Já a viabilidade das células da amostra de pitanga apresentou um primeiro pico no momento 44 horas, logo após o primeiro aumento de temperatura de 19 °C para 25 °C, podendo relacionar esse aumento à uma melhor adaptação da

célula a uma temperatura mais elevada e uma adaptação à condição anaeróbica de fermentação.

A viabilidade celular da amostra P1 teve valores acima de 60% no ponto 44h e no ponto 92h apresentou viabilidade celular acima de 80%, indicando que ao longo do processo, as células foram se adaptando.

Os dados de viabilidade celular das amostras estão dispostos na Figura 13 em forma de gráfico.

Figura 13: Viabilidade celular em %



Fonte: Autor

5.2.4 Consumo de substrato

O consumo de substrato foi medido em °Brix, expressos na Tabela 3 e convertido na Figura 14 em densidade específica em g/cm³, para tornar o valor referente apenas à presença de sólidos solúveis no mosto, não contabilizando o álcool produzido ao longo da fermentação.

A amostra M1 apresentou um consumo de substrato lento e com pequenas estagnações ao longo do experimento, garantindo uma atenuação lenta e adaptativa do mosto. Já a amostra de P1 apresentou consumo inicial e, do ponto 20h ao ponto 72h, estagnou, voltando a consumir no ponto seguinte de forma lenta.

A baixa atenuação de ambas as amostras pode estar relacionada a dificuldade de adaptação das leveduras ao processo fermentativo, ao stress gerado pela baixa de temperatura inicial de fermentação e/ou a taxa de inoculação.

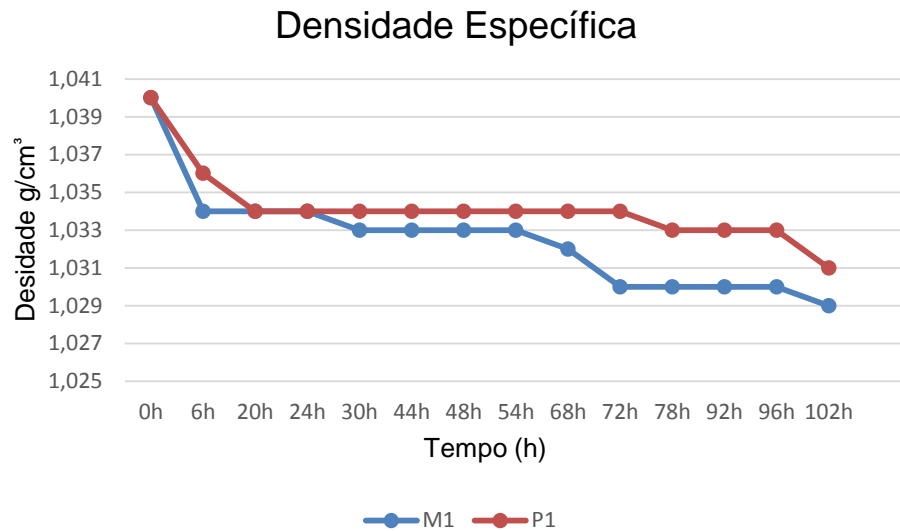
Segundo Melniko (2007), que avaliou a fermentação primária para produção de cervejas de alta densidade, o aumento de temperatura tem relação direta com o aumento de consumo de substrato.

Na Figura 14 também pode-se observar que entre os pontos 96h e 102h ocorreu atenuação do mosto, indicando que possivelmente os experimentos foram encerrados antes do término da fermentação.

Tabela 3: Dados do consumo de substrato expressos em °Brix

Tempo (h)	M1 °Brix	P1 °Brix
0h	10	10
6h	9,2	9,6
20h	9,2	9,3
24h	9,2	9,3
30h	9,1	9,3
44h	9,1	9,3
48h	9,1	9,2
54h	9,1	9,2
68h	9	9,2
72h	8,6	9,2
76h	8,6	9,1
92h	8,6	9,1
96h	8,6	9,1

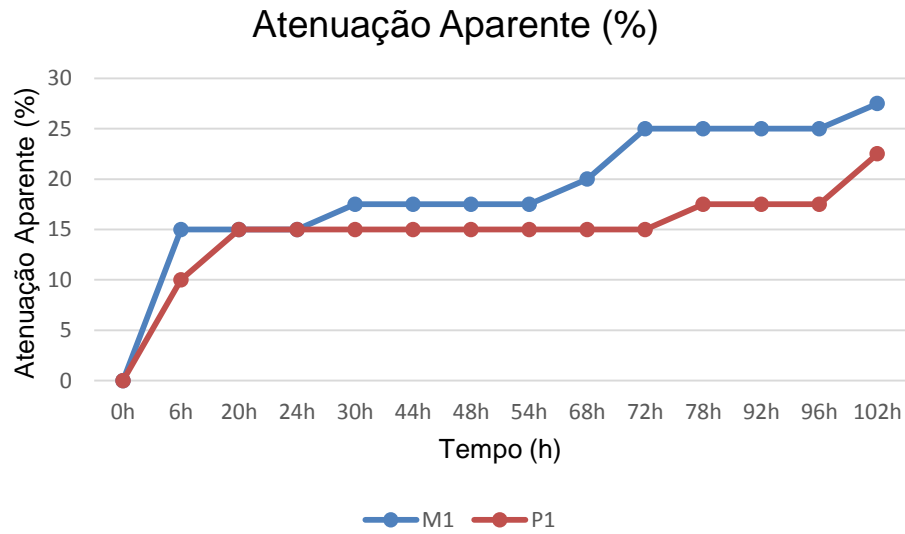
. Fonte: Autor

Figura 14: Atenuação do mosto cervejeiro

Após o ponto 102 h, ambas as amostras foram colocadas a uma temperatura de refrigeração para parar o processo fermentativo, forçando o processo de floculação celular, com a finalidade de diminuir a turbidez no momento do envase.

No décimo quinto dia após o envase, foram feitas novas análises de °Brix, que quando convertidos em densidade aparente, apresentaram valores menores do que os coletados no ponto 102h, sendo 1,011 g/cm³ para a amostra M1 e 1,007 g/cm³ para a amostra P1, comprovando que a levedura ainda apresentava capacidade de atenuação. Em porcentagem, a amostra M1 conseguiu atenuar 72,5% da capacidade total do mosto e a amostra P1 atenuou 82,5%.

De acordo com FERMENTIS (2017), o comportamento da levedura *S. cerevisiae* é representado de forma exponencial em relação a porcentagem de atenuação do mosto, no entanto, de acordo com a Figura 15, podemos observar que ambas as amostras apresentaram uma atenuação linear e com a presença de rampas ao longo da fermentação, podendo ser explicada pela falta de adaptação das leveduras ao mosto cervejeiro e ao processo fermentativo.

Figura 15: Atenuação em porcentagem das amostras

5.2.5 Produção de etanol

A ebulliometria foi feita para avaliar a concentração de etanol no produto final. Os valores obtidos através da ebulliometria para a produção de etanol estão descritos na tabela abaixo:

Tabela 3: Teor Alcoólico das cervejas produzidas

Amostra	Teor Alcoólico em °GL
Mel	3,2
Pitanga	3,85

Fonte: Autor

O teor alcoólico obtido nas amostras está dentro dos parâmetros estabelecidos pela ANVISA no decreto nº 2.314/1994 (BRASIL, 1997), que compreende de 2,0 à 4,5% ou °GL.

De acordo com a BJCP- Beer Judge Certification Program (2015), ambas as cervejas obtidas se encaixam na categoria de Intensidade Session, que compreende cervejas com teor alcoólico abaixo de 4%.

6 CONCLUSÕES

O processo de isolamento de leveduras selvagens para fins cervejeiros demonstrou-se viável apresentando microrganismos capazes de promover a fermentação, porém acredita-se obter melhores resultados a partir da identificação da levedura a nível de gênero ou espécie.

Os substratos mel e pitanga garantiram o isolamento das leveduras utilizadas na fermentação e produção de cerveja.

A produção cervejeira com a utilização das leveduras selvagens de pitanga e mel de cupira produziu *off-flavours* similares a esparadrapo, porém, através do uso de adaptação com o reaproveitamento em várias bateladas, tanto os aspectos sensoriais como os cinéticos podem ser otimizados.

Os resultados obtidos nesse trabalho fornecem dados e possibilidades para trabalhos futuros, a fim de otimizar os processos de isolamento e domesticação de leveduras selvagens para fins cervejeiros.

REFERÊNCIAS

- AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial** – vol. 4. 1ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher, p 91-144. 2001
- AQUARONE, E. et al. **Biotecnologia Industrial. In: Biotecnologia na Produção de Alimentos**, v. 4, São Paulo: Edgard Blucher, 2002.
- ARAÚJO, F.B.; SILVA, P.H.A.; MINIM, V.P.R. **Perfil sensorial e composição físico-química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 23 (2):121-128, maio-ago. 2003.
- AURICCHIO, M. T. et al. **Atividade Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora***. Lat. Am. J. Pharm. 26 (1): 76-81; 2007.
- BAMFORTH, C. W. **Beer: Tap Into the Art and Science of Brewing**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 233p, 2003.
- BARBOSA, R. N. et al. **Prospection on Yeasts from Stingless Bees Honey in Brazilian Tropical Dry Forest (Caatinga)**, Gaia Scientia, Volume 10(4) 151-159p, 2016.
- BEZERRA, J. E. F.; SILVA JR., J.F. da; LEDERMAN, I.E. **Pitanga (*Eugenia uniflora* L.)** Jaboticabal: Funep, 30p, 2000.
- BEZERRA, J. E. F. et al. **Comportamento da pitangueira (*eugenia uniflora* l) sob irrigação na região do vale do rio moxotó, Pernambuco**. Rev. Bras. Frutic., Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, p. 177-179, Abril, 2004.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yest & Fermentation**. Blackwell Science LTD, 644p, 2001.

BRASIL. Decreto n. 2314, de 04 de setembro de 1997. Regulamenta a Lei nº 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. Diário Oficial da União, DF, 05 set. 1997.

BRIGGS, D. E. et al. **Brewing Science and Practice**. Flórida: CRC Press LLC and Woodhead Publishing Limited, 863p, 2004.

CERVESIA. **Mercado Cervejeiro**, 2017. Disponível em www.cervesia.com.br. Acesso em: 17/11/17.

CLERCK, J. **Cours de brasserie**, vol II. p. 608-609. Institute Agronomique, Bélgica, 1962

COSTA, M. R. **Estudo comparativo das hidrolises ácidas e enzimas de matérias primas amiláceas visando a obtenção de etanol**. Alagoas, Programa de Pós-Graduação em engenharia química, UFAL, 2010. Dissertação de mestrado, 108 p, 2010.

DIRKSEN, M; MULLER, G. **Isolamento de leveduras com capacidade fermentativa de mosto cervejeiro oriundas de fermentação espontânea de *Malpighia glabra*** In: CERVECÓN, Congresso Latino Americano de Ciência e Mercado Cervejeiro, 2016, Blumenau – SC. 424p, 2016.

DRAGONE, G.; SILVA, J. B. A. **Cerveja**. Em: VENTURINI-FILHO, W.G. Bebidas. V1: Bebidas Alcoólicas Ciência e Tecnologia. São Paulo: Ed Blucher, 461p, 2010.

FERMENTIS. **Tips and tricks Active dry yeast and fermentation explained to brewers**. Disponível em: <https://fermentis.ovh/wp-content/uploads/2017/09/Brochure_Tips_and_Tricks_GB_web_planche-bd.pdf> Acesso em: 18 nov. 2017.

FUGELSANG, K. C.; EDWARD, C. G. **Wine microbiology. Practical applications and procedures.** 2 ed. New York: The Chapman & Hall Enology Library, 393p, 1997.

GARCIA, M. M. E. **Produção de cerveja: Utilização de estirpes não-convencionais em co-fermentação com *Saccharomyces* para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja.** Dissertação de Mestrado (Tese) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade de Lisboa, 46p, 2017.

IAL - INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4.ed. São Paulo: IAL, 2008

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting.** 2^oed. Germany: VLB, 726p,1999.

MELNIKOV, G. M. D, **Fermentação primária para produção de cervejas de altas densidades por processo contínuo utilizando leveduras imobilizadas em bagaço de malte.** Tese de Doutorado (Tese) -Universidade de São Paulo Escola de Engenharia de Lorena, 86p, 2007

MOREIRA, B. G. **Diferenciação de Bebidas Alcoólicas e Não alcoólicas no Sistema de Medição de Vazão (SMV) durante o Envase.** Dissertação de Mestrado (Dissertação) – Programa de Pós Graduação em Metrologia, Qualidade e Inovação (Pós MQI), Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,143p, 2005.

MORNEAU, A.D, ZUEHLKE, J.M. e EDWARDS, C.G. 2011. **Comparison of Media Formulations Used to Selectively Cultivate *Dekkera/Brettanomyces*.** Letters in Applied Microbiology 53 (4): 460–65.doi:10.1111/j.1472-765X.2011.03133.x

PELCZAR JR et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações.** 2 ed. São Paulo: Makron Books do Brasil, 1996

PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. **Industrial Microbiology.** 2.ed. New York: McGraw-Hill, 923p, 1949.

REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology**. V.3, 1st Edition, Germany: Verlag Chemie, 642p, 1983.

ROSA, C. A. *et al.*, **Yeast communities associated with stingless bees**. FEMS Yeast Research, 4: 271–275, 2003.

SILVA, G. A. da. **The occurrence of Killer sensitive and neutral yeast in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on Killing behaviour**. Appl. Microbiol. Biotechnol. Berlin, v46, p 112-121, 1996

SLEIMAN, MURIS *et al.* **Determinação do percentual de malte e adjuntos em cervejas comerciais brasileiras através de análise isotópica**. Ciênc. agrotec., Lavras , v. 34, n.1, p. 163-172, Feb. 2010.

SOUSA, B. A. **Caracterização dos méis de meliponíneos no Brasil: situação atual e perspectivas**. In: Congresso Ibero-latinoamericano de apicultura, 10., 2010, Natal.

SPARRE'S BREWERY. **Plato, SG and Brix conversion formulas**. Disponível em: <<https://biohazardbrewery.wordpress.com/brewing-links/brewery-math/plato-sg-brix-conversion-formulas/>> Acesso em: 12 nov. 2017.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e Cervejarias: A história, a arte e a tecnologia**. Editora Aden, São Paulo, 2001.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 10 ed. ARTMED, 894p, 2011.

VILLAS-BÔAS, J. **Manual Tecnológico: Mel de Abelhas sem Ferrão. Brasília – DF**. Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 15p, Brasil, 2012..

VIT, P. *et al.* **Pot-Honey: A legacy of stingless bees.**, Springer-Verlag New York, 385p, 2013.

VIZZOTTO, M., **Fitoquímicos em pitanga (*Eugenia uniflora* L.): seu potencial na prevenção e combate a doenças.** Simpósio Nacional do Morango, 3.; Encontro sobre pequenas frutas e frutas nativas do mercosul, Pelotas, 2., 2006.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **YEAST: The practical guide to beer fermentation.** Brewers Publication, Colorado, 165p, 2010.