



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRARIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE RECURSOS
NATURAIS

TALITA ABRANTE LEITE

USO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* COMO ADITIVO NA PRODUÇÃO DE
UMA CERVEJA ARTESANAL DE ALTA FERMENTAÇÃO

FORTALEZA
2021

TALITA ABRANTE LEITE

USO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* COMO ADITIVO NA PRODUÇÃO DE UMA
CERVEJA ARTESANAL DE ALTA FERMENTAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Ciência e tecnologia de alimentos

Orientador: Prof. Dr. André Luís Coelho da Silva.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- L556u Leite, Talita Abrante.
 Uso da microalga *Chlorella vulgaris* como aditivo na produção de uma cerveja artesanal de alta fermentação / Talita Abrante Leite. – 2021.
 99 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, Fortaleza, 2021.
 Orientação: Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva.
1. Aditivo cervejeiro. 2. *Chlorella vulgaris*. 3. Bebida funcional. I. Título.

CDD 680.8

TALITA ABRANTE LEITE

USO DA MICROALGA *Chlorella vulgaris* COMO ADITIVO NA PRODUÇÃO DE UMA
CERVEJA ARTESANAL DE ALTA FERMENTAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de conhecimento: Ciência e tecnologia de alimentos

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bartolomeu Warlene Silva de Souza
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr(a). Francisca Gleire Rodrigues de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Mayron Alves de Vasconcelos
Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG)

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À Instituição CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

À Deus, por ter conduzido meus passos até aqui e me dado força e perseverança nessa caminhada.

Aos meus pais, Cleide e Orlando, pelos ensinamentos, amor e companheirismo dedicados a mim durante toda a minha vida e principalmente durante os árduos anos de pós-graduação. Sem vocês eu nada seria.

Ao meu noivo Anderson. Sua compreensão, força e amor me ajudaram a chegar aonde estou hoje. Você foi capaz de acreditar em mim quando nem mesmo eu acreditava.

Ao meu querido orientador Dr. André Luís Coelho, que me acolheu muito mais que como aluna, como filha. Dizer que fui formada por um profissional exemplar igual a você me enche de orgulho. Seus ensinamentos e puxões de orelha serão levados para a eternidade. Espero um dia chegar aos pés da pessoa e profissional que és.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia de Recursos Naturais, em especial a figura do professor Dr. Bartolomeu Souza, que contribuíram com minha formação durante esses cinco anos.

Ao meu amigo Wallady Barroso. Sem sua ajuda eu não chegaria ao final dessa jornada. Seu companheirismo foi fundamental durante esses anos de lutas e glórias.

À minha amiga Vanessa Feitosa, por ter trilhado essa caminhada ao meu lado desde o primeiro dia de iniciação científica. Foram muitos momentos de aprendizado e amor compartilhados.

À minha família LabBMol. Samara, Vinícius, Mario, Fábio, Germana, Bruna, Jéssica, Samuel, Leonardo e Samille, vocês fizeram os meus dias mais alegres e tornaram a caminhada mais fácil.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.” (Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

O crescimento do mercado cervejeiro artesanal e sua busca por novos aromas e sabores, associado ao crescimento do mercado de alimentação natural e saudável, abriu um universo de opções de ingredientes cervejeiros utilizados no processo de fabricação. O setor cervejeiro, buscando inovar, tem investido na pesquisa de alimentos nutricionalmente ricos e provenientes de fontes naturais, que podem ser incorporados no processo de produção da cerveja e que proporcionem ao público produtos com atividades funcionais atraentes e benefícios à saúde de quem os consome. Uma das fontes consideradas promissoras para esse fim são as microalgas, fornecedoras naturais de compostos ativos com alto valor nutricional e importantes efeitos terapêuticos. Dentre as microalgas, destacamos a *Clorella vulgaris*, espécie *Generally Recognized As Safe* (GRAS), aprovada para consumo humano e rica em proteínas e compostos antioxidantes. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo desenvolver uma cerveja artesanal de alta fermentação utilizando como aditivo o extrato da microalga *Chlorella vulgaris*. O extrato microalgal foi produzido com biomassa cultivada em meio autotrófico, submetida a processos de lise física (congelamento + descongelamento + ultrassom) em meio aquoso. Para avaliar o uso da microalga como aditivo cervejeiro, foram elaboradas duas cervejas artesanais de alta fermentação (estilo Ale), uma sem adição do extrato e a outra com a adição do extrato microalgal. A cinética do processo fermentativo e as características físico-químicas (pH, cor, amargor, teor alcoólico) das duas formulações foram avaliadas e comparadas, para avaliar a influência do extrato microalgal no processo. Em seguida, a capacidade de sequestro de radicais livres, tanto do extrato microalgal, como das cervejas controle e aditivada foram avaliadas pelo teste do DPPH. A adição do extrato microalgal no processo produziu cervejas de coloração esverdeada, com atividade antioxidante superior a encontrada na cerveja não aditivada, com características físico-químicas semelhantes às características da cerveja controle e dentro da faixa determinada pela *Beer Judge Certification Program* (BJCP) para o estilo produzido. De posse dos resultados, é possível determinar que é exequível a produção de uma cerveja funcional com a adição de microalgas.

Palavras-chaves: aditivo cervejeiro; *Chlorella vulgaris*; bebida funcional.

ABSTRACT

The growth of craft beer market and its search for new flavors and aromas, aligned with the expansion of the natural and health food market, started new discussion about ingredients that are used for brewing. Seeking to innovate in this segment, the brewing sector has invested in research into nutritionally rich foods from natural sources, brewing new products with attractive functional properties to the consumers. One of the promising sources for this purpose is microalgae a natural supplier of active compounds with high nutritional value and important therapeutic effects. Among microalgae, we highlight *Chlorella vulgaris*, a Generally Recognized As Safe (GRAS) species, approved for human consumption and rich in proteins and antioxidant compounds. Therefore, the present work aimed to develop a high-fermentation craft beer using *Chlorella vulgaris* microalgae extract as an additive. The microalgal extract was produced with biomass grown in an autotrophic medium, submitted to physical lysis processes (freezing + thawing + ultrasound). To evaluate the use of microalgae as a brewing additive, two high fermentation craft beers (Ale style) were produced, one without the addition of the extract and the other with the addition of the microalgae extract. The kinetics of the fermentation process and the physicochemical characteristics (pH, color, bitterness, alcohol content) of the two formulations were evaluated and compared. Then, the free radical scavenging capacity of the microalgae extract and both beers, the control and additive beer, were evaluated by the DPPH test. The results showed that the addition of microalgal extract in the beer formulation was not able to influence the fermentation kinetics of the process. The addition of microalgae extract in the process produced greenish-colored beers, with antioxidant activity superior to that found in non-additivated beer, with physicochemical characteristics similar to those of the control beer and within the range determined by the Beer Judge Certification Program (BJCP) for the chosen beer style. With the results, it is possible to determine that it is feasible to produce a functional beer with the addition of microalgae.

Palavras-chaves: brewing additive; *Chlorella vulgaris*; functional beverage.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição das cervejarias por municípios do Brasil.....	19
Figura 2 -	Morfologia dos cones de lúpulo e as glândulas de lupulina.....	25
Figura 3 -	Metabolismo do mosto pelas leveduras.....	32
Figura 4 -	Cervejas com adição de frutas brasileiras.....	36
Figura 5 -	Preparações alimentícias desenvolvidas com a adição de microalgas, em sua totalidade ou em parte.....	41
Figura 6 -	Cultivo de microalga <i>Chlorella vulgaris</i> em fotobiorreator retangular de placa planar.....	48
Figura 7 -	Biomassa microalgal liofilizada de <i>C. vulgaris</i>	58
Figura 8 -	Extrato de células lisadas <i>Chlorella vulgaris</i>	64
Figura 9 -	Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 15%) do extrato aquoso obtido a partir da biomassa microalgal de <i>Chlorella vulgaris</i> . (1) Marcadores moleculares; (2) Extrato bruto.....	66
Figura 10 -	Cerveja estilo APA produzida com a adição do extrato microalgal de <i>C. vulgaris</i>	77
Figura 11 -	Cerveja estilo APA produzida com a adição do extrato microalgal de <i>C. vulgaris</i> após 2 anos de armazenamento.....	78

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Produção nacional de cerveja em milhões de hectolitros por ano.....	16
Gráfico 2 -	Número de microcervejarias registradas por ano no Brasil.....	17
Gráfico 3 -	Distribuição de cervejarias por região no Brasil.....	18
Gráfico 4 -	Perfil de temperatura de um programa típico de infusão.....	30
Gráfico 5 -	Curvas de crescimento das células de <i>Chlorella vulgaris</i> cultivadas em meio NPK utilizando fotobiorreator fechado. (A) gráfico construído a partir dos dados obtidos com a contagem diária de células; (B) gráfico produzido a partir leitura da absorbância (a 690 nm) do meio de cultivo.....	61
Gráfico 6 -	Cinética do processo fermentativo da cerveja ativada com o extrato bruto da microalga <i>Chlorella vulgaris</i>	72
Gráfico 7 -	Variação de pH durante a fermentação primária da cerveja aditivada com o extrato aquoso de <i>Chlorella vulgaris</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diferentes composições da água utilizada na produção de estilos específicos de cerveja.....	21
Tabela 2 -	Parâmetros de qualidade da água servida de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS e EU.....	22
Tabela 3 -	Especificações do mosto de estilos de cerveja variados.....	30
Tabela 4 -	Lista de alguns pedidos de patentes relacionadas à aditivos cervejeiros depositados no INPI.....	37
Tabela 5 -	Avaliação nutricional de algumas microalgas comercializadas.....	39
Tabela 6 -	Empresas, localização, microalgas cultivadas, seus produtos e a atividade biológica atribuída.....	40
Tabela 7 -	Algumas das atividades biológicas relacionadas à espécie de <i>Chlorella vulgaris</i>	42
Tabela 8 -	Produtos obtidos a partir de <i>Chlorella vulgaris</i> e suas aplicações.....	44
Tabela 9 -	Análise centesimal da biomassa microalgal de <i>C. vulgaris</i> com base em 100 g da massa seca.....	63
Tabela 10 -	Determinação da concentração de proteínas solúveis totais do extrato bruto aquoso obtido a partir da biomassa microalgal de <i>Chlorella vulgaris</i>	65
Tabela 11 -	Capacidade de sequestro do DPPH do extrato bruto da biomassa microalgal e da cerveja artesanal aditivada com o extrato bruto das microalgas <i>C. vulgaris</i>	68
Tabela 12 -	Capacidade de sequestro do DPPH da cerveja aditivada com extrato aquoso de <i>C. vulgaris</i> armazenada por 2 anos.....	70
Tabela 13 -	Caracterização físico-química da cerveja artesanal aditivada com extrato de <i>Chlorella vulgaris</i>	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Bovine Serum Albumin
AcervA	Associação de cervejeiros artesanais
APA	<i>American Pale Ale</i>
ARA	Ácido araquidônico
ATP	Adenosina trifosfato
BMBRI	<i>Brewing and Malting Research Institute</i>
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CBBP	Companhia Brasileira de Bebidas Premium
CIP	<i>Clean in place</i>
DF	Densidade final
DHA	Ácido decosahexanoíco
DO	Densidade original
EBC	<i>European Brewery Convention</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
EUA	Estados Unidos da América
FAN	<i>Free amino nitrogen</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GRAS	Generally Recognized As Safe
IBU	Unidade de medida de amargor
INPI	Instituto Nacional da propriedade Industrial
IPC	Classificação Nacional de Patentes
LDPP	Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NPK	Nitrogênio, Fósforo e Potássio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PVPP	Polivinilpirrolidona
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
SEBRAE	Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Mercado da cerveja artesanal no Brasil.....	16
1.2	Componentes da cerveja.....	20
1.2.1	Água.....	21
1.2.2	Malte.....	23
1.2.3	Lúpulo.....	24
1.2.4	Levedura.....	26
1.2.5	Adjuntos.....	28
1.3	Processo cervejeiro.....	28
1.3.1	Malteação.....	28
1.3.2	Mostura (Brassagem).....	29
1.3.3	Lupulagem e fervura.....	31
1.3.4	Fermentação.....	32
1.4	Inovações do mercado.....	33
1.5	Uso e benefício das microalgas como aditivos alimentares.....	38
1.6	<i>Chlorella vulgaris</i>	41
2	OBJETIVO.....	46
2.1	Objetivo geral.....	46
2.2	Objetivos específicos.....	46
3	MATERIAIS.....	47
3.1	Microalgas.....	47
3.2	Meios de cultura e Reagentes.....	47
4	MÉTODOS.....	48
4.1	Cultivo da microalga <i>in door</i> da microalga <i>Chlorella vulgaris</i> para produção de biomassa.....	48
4.2	Quantificação da biomassa por turbidimetria e contagem celular.....	49
4.3	Coleta e processamento da biomassa microalgal.....	49
4.4	Caracterização da biomassa microalgal.....	49
4.5	Preparo do extrato de microalga.....	49
4.6	Dosagem de proteínas solúveis do extrato microalgal.....	50

4.7	Análise eletroforética do extrato microalgal.....	50
4.8	Preparo da cerveja artesanal (estilo Ale) aditivada com microalgas.....	51
4.8.1	<i>Moagem</i>	51
4.8.2	<i>Mosturação</i>	51
4.8.3	<i>Teste do iodo</i>	51
4.8.4	<i>Encerramento da mosturação (Mash out)</i>	51
4.8.5	<i>Recirculação do mosto</i>	51
4.8.6	<i>Transferência do mosto e Sparing</i>	52
4.8.7	<i>Lupulagem e adição do extrato de microalgas</i>	52
4.8.8	<i>Concentração de sedimentos (Whirpool)</i>	52
4.8.9	<i>Resfriamento e transferência do mosto para do fermentador</i>	53
4.8.10	<i>Ativação da levedura</i>	53
4.8.11	<i>Inoculação, fermentação primária e maturação da cerveja</i>	53
4.8.12	<i>Priming, envase e carbonatação da cerveja</i>	53
4.9	Análises físico-químicas da cerveja.....	54
4.9.1	<i>Cinética fermentativa</i>	54
4.9.2	<i>Determinação de amargor</i>	54
4.9.3	<i>Determinação da intensidade da cor</i>	55
4.9.4	<i>Determinação do pH</i>	55
4.10	Análise da atividade antioxidante do extrato microalgal e da cerveja aditivada com o extrato de microalgas.....	55
4.11	Análise sensorial da cerveja.....	56
5	RESULTADOS.....	58
5.1	Rendimento da microalga <i>C. vulgaris</i> cultivada em fotobiorreator fechado.....	58
5.2	Curva de crescimento da microalga <i>C. vulgaris</i>	60
5.3	Caracterização da biomassa microalgal.....	62
5.4	Preparo do extrato de microalgas e dosagem de proteínas solúveis.....	63
5.5	Análise eletroforética do extrato microalgal.....	66
5.6	Análise da atividade antioxidante do extrato microalgal e da cerveja aditivada com o extrato de microalgas.....	67
5.7	Cinética do processo fermentativo.....	71

5.8	Avaliação do pH durante o processo fermentativo.....	73
5.9	Análise físico-química da cerveja artesanal aditivada com extrato de <i>Chlorella vulgaris</i>	75
5.10	Análise sensorial.....	78
6	CONCLUSÃO.....	79
	REFERÊNCIAS.....	80

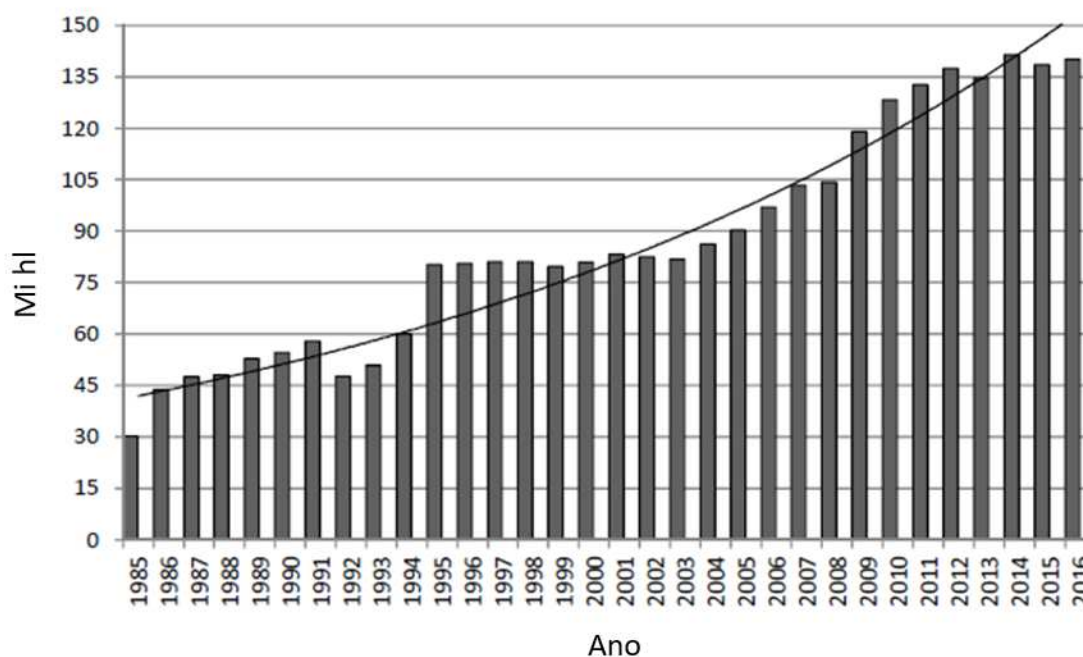
1. INTRODUÇÃO

1.1. Mercado da cerveja no Brasil

Beber cerveja no Brasil é quase um ato cultural. Seu consumo está associado a momentos de lazer, distração e comemoração e se intensifica nos dias de calor, já que boa parte dos brasileiros associa a bebida à sensação de refrescância, motivo da bebida ser chamada popularmente de "gelada".

O país possui hoje mais de 27.329 produtos cervejeiros registrados. Esse valor é reflexo da nossa produção anual, que desde os anos 90 vem crescendo e ganhando destaque (MAPA, 2020). Só no ano de 2016 foram produzidos cerca de 140 milhões de hectolitros (mi hl) de cerveja (Gráfico 1), fazendo com que o país alcançasse o 3º lugar no ranking mundial de produtores, ficando atrás apenas de países como China (460 mi hl) e Estados Unidos (221 mi hl) (CERVBRASIL, 2016).

Gráfico 1- Produção nacional de cerveja em milhões de hectolitros por ano.



Fonte: CERVBRASIL (2016).

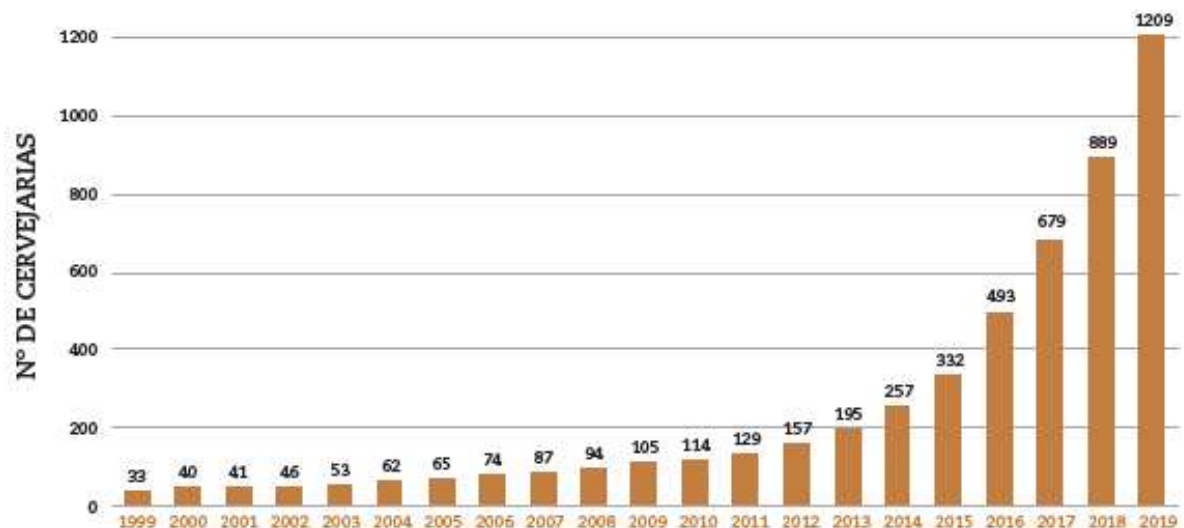
O mercado consumidor atual está dividido em dois seguimentos principais, o das "cervejas comuns", produzidas em larga escala, por grandes cervejarias, sendo estas as mais consumidas no país, e as "cervejas especiais" ou "cervejas premium", produzidas em menor volume e com produtos de qualidade superior. A produção

dessas cervejas especiais é dividida entre as grandes marcas nacionais, internacionais e entre as microcervejarias (SEBRAE, 2016).

Em 2014, a produção de cerveja era liderada por três conglomerados industriais que juntos abasteciam cerca de 99% do mercado brasileiro, deixando as microcervejarias apenas com 1% de todo o mercado. Contudo, nos últimos anos essa realidade vem se modificando. Além da paixão brasileira pela bebida, o aumento no consumo de cervejas do tipo "premium" faz com que o mercado brasileiro fature bilhões todos os anos e a busca por uma fatia desse mercado acaba estimulando o empreendedorismo com a criação e inserção de novas microcervejarias (SEBRAE, 2016).

Nos últimos 10 anos o número de cervejarias no Brasil vem aumentando, sendo puxado pela abertura de novas microcervejarias. Segundo o MAPA, atualmente estão registrados no país 1209 cervejarias (Gráfico 2), sendo 320 novas cervejarias registradas só no ano de 2019 (MAPA, 2020), o que confirma a expansão do setor mesmo no período de recessão econômica. Entretanto, esse número ainda não reflete a quantidade total de cervejarias e microcervejarias presentes no mercado, já que os registros feitos pelo MAPA não incluem as empresas que não possuem estrutura física, as chamadas cervejarias "ciganas" (MARCUSO; MULLER, 2017).

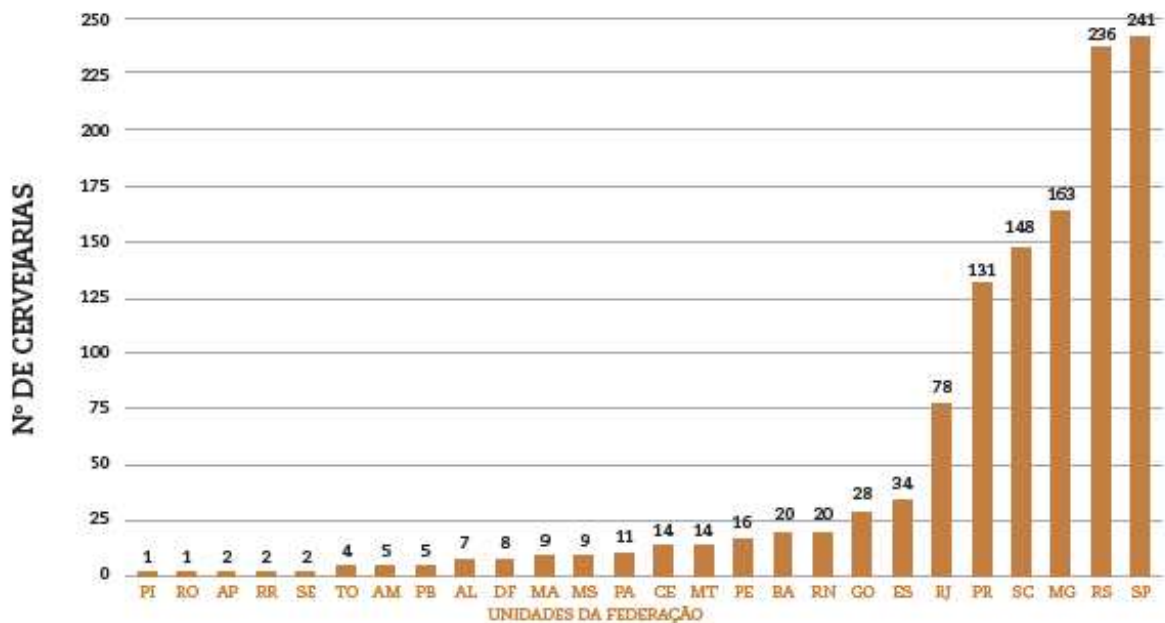
Gráfico 2 - Número de registros de cervejarias no Brasil por ano.



Fonte: MAPA (2020)

A distribuição desses estabelecimentos pelo país ainda não é homogênea. A forte influência que a comunidade europeia, sobretudo a alemã, exerce na região Sul do país favoreceu o setor microcervejeiro dessa região, que somando-se ao da região Sudeste concentram 80% dos estabelecimentos registrados (Gráfico 3). No ano de 2017 essa concentração era de 83%. Regiões como o Centro-Oeste e o Nordeste, embora com menor tradição nesse mercado veem ganhando visibilidade e o setor está sendo alavancado com o surgimento de microcervejarias inovadoras e premiadas nacional e internacionalmente (MARCUSO; MULLER, 2017; MAPA, 2020).

Gráfico 3 – Número de registros de cervejarias por estado no ano de 2019.



Fonte: MAPA (2020)

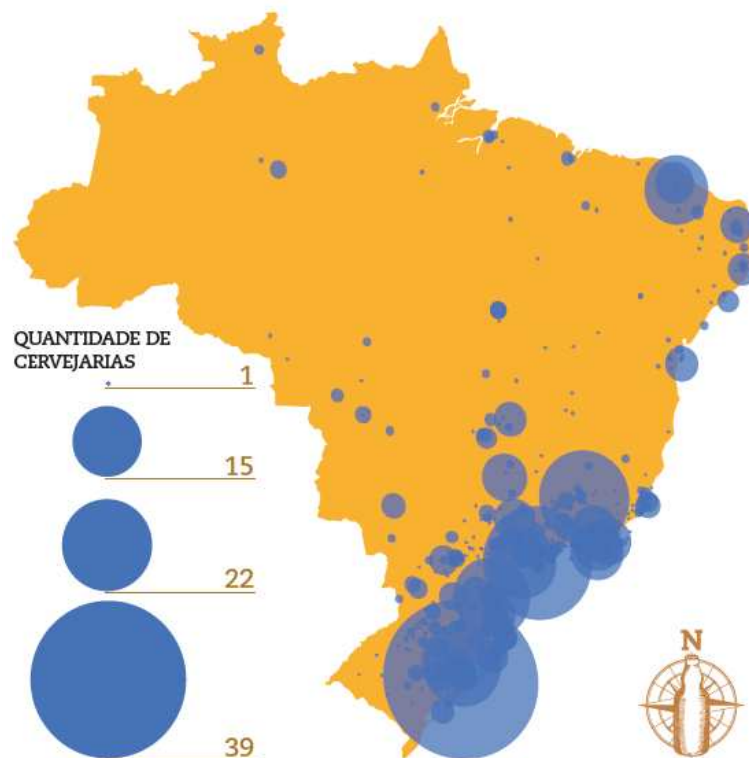
O Ceará já se encontra no mapa da indústria cervejeira há algum tempo. O estado é um polo de abastecimento das regiões Norte e Nordeste e conta com a sede de grandes empresas como a AMBEV e a Heineken.

Com o crescimento do mercado de cervejas "artesanais" ou "premium" e o número cada vez maior de cervejeiros caseiros, em 2003 surgia no estado a Associação de Cervejeiros Artesanais (AcervA-Ce). "A missão da AcervA é difundir e aprimorar o estudo de temas relacionados à cerveja, especialmente dos aspectos técnicos da produção caseira e promover a integração e a amizade entre pessoas que

gostam de produzir, beber, estudar e conversar sobre cerveja artesanal.” (ACERVA, 2021).

Com essa cultura cervejeira já bem estabelecida, em 2016 foi inaugurada a primeira cervejaria artesanal do estado. Na ocasião de sua inauguração já possuía dois rótulos premiados (O ESTADO, 2016). Assim, o mercado que já vinha ganhando fôlego com a presença de lojas e bares especializados na área, ganhou força com a possibilidade de virar um polo cervejeiro artesanal. O Ceará conta hoje com 13 microcervejarias, sendo duas delas situadas na região do Cariri, além das cervejarias AMBEV e Heineken (Figura1) (MAPA, 2020)

Figura 1 – Distribuição das cervejarias por municípios do Brasil



Fonte: MAPA (2020)

Mesmo com o mercado nacional e o estadual em ascensão, as microcervejarias enfrentam grandes desafios com relação ao crescimento e desenvolvimento. Os problemas passam pela capacidade produtiva; dificuldade de espaço para promoção de produtos; logística de distribuição; tributação e custos de

importação. Mesmo com a criação de empreendimentos especializados no fornecimento de insumos, matérias-primas e equipamentos, essas empresas ainda precisam importar uma gama de produtos que não está disponível no Brasil, o que aumenta o valor de produção da bebida (INSTITUTO DA CERVEJA BRASIL, 2017).

Outra barreira está relacionado a legislação brasileira. Microempresas desse nicho econômico são tributadas da mesma maneira que grandes empresas, o que torna o produto final mais caro. Empresas de grande porte recebem incentivos fiscais do governo e também se beneficiam das vantagens econômicas advindas das grandes compras de matérias-primas, o que não ocorre com os pequenos e médios produtores (INSTITUTO DA CERVEJA BRASIL, 2017).

Todas essas problemáticas ainda precisam ser superadas para que o setor brasileiro cresça com todo o seu potencial, alcance o mercado mundial e se concretize como uma escola cervejeira.

1.2 Componentes da cerveja

No Brasil, o primeiro decreto que define o conceito de cerveja foi criado em 1997 (Decreto nº 2314/97), tendo como base a Lei de Pureza alemã, e diz que cerveja é uma “(...) bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo”. Contudo, hoje, a legislação brasileira considera cerveja como:

“...bebida resultante da fermentação, a partir de levedura cervejeira, do malte de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo, hipótese em que uma parte da cevada malteada ou do extrato de malte poderá ser substituída parcialmente por adjunto cervejeiro”. (Decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019).

Esse decreto altera ao anexo Decreto nº 6871, de 4 de junho de 2009, e enquanto estiver em vigor deve ser considerado pelos empresários que atuam ou pretendem atuar na fabricação de cervejas.

As matérias-primas utilizadas no processo de fabricação é extremamente amplo, quando se considera a legislação brasileira, e podem incluir além do cereais maltados (geralmente cevada), os cereais não maltados (milho, trigo, arroz, sorgo, aveia, cevada), açúcar e xaropes (geralmente chamados de adjuntos, de aditivos

(incluindo algumas enzimas) e auxiliares de processamento que participam em reações químicas, como por exemplo, sílica gel e polivinilpolipirrolidona (PVPP) (RDC 64/2011; RDC 65/2011).

1.2.1 Água

A água é a principal e mais importante matéria-prima do processo cervejeiro. Aproximadamente entre 91% e 98% do peso da cerveja é constituída por água. Contudo sua importância não se dá apenas no produto final. A água é indispensável nos processos de limpeza da planta da fábrica usando sistemas manuais ou de limpeza no local (*cleaning-in-place* - CIP); na lavagem de tanques, barris e garrafas; e na geração de calor ou frio nas fábricas (RUSSEL; STEWART 1995; VENTURINI FILHO, 2000; LIMA; FILHO, 2011).

A água utilizada no processo pode ser oriunda de muitas fontes, como lagos, rios, oceanos, neve, chuva, entre outros. Por muitos anos, a presença de fontes naturais era determinante na escolha de um local para a instalação de uma cervejaria (EUMANN; SCHAEBERLE, 2016).

Historicamente, diferentes regiões ficaram famosas por tipos específicos de cerveja e em parte esses estilos de cerveja foram definidos pela água usada no processo de produção (Tabela 1).

Tabela 1 - Diferentes composições da água utilizada na produção de estilos específicos de cerveja.

		<i>Munich</i>	<i>Dortmund</i>	<i>Vienna</i>	<i>Burton on Trent</i>	<i>Pilsen</i>
Dureza total	ppm CaCO ₃	264	737	689	980	28
Alcalinidade	ppm CaCO ₃	253	300	551	262	23
Dureza não carbonatada	ppm CaCO ₃	11	437	138	718	5
Cálcio	ppm CaCO ₃	189	655	407	880	18
Magnésio	ppm CaCO ₃	75	82	282	100	10
Alcalinidade residual	°G	10,6	5,7	22,1	-0,2	0,9
Sólidos secos	Ppm	284	1110	948		51

Fonte: Adaptada de BAMFORTH (2016)

Com o passar dos anos, tornou-se essencial a padronização da água utilizada no processo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) toda água utilizada para consumo ou no preparo de gêneros alimentícios, deve apresentar padrões de qualidade de uma água potável (Tabela 2). O básico é estar limpa e livre de germes e substâncias nocivas.

Tabela 2 - Parâmetros de qualidade da água servida, de acordo com os parâmetros estabelecidos pela OMS e EU.

Parâmetro		Range	
		Min	Max
Dureza total	ppm CaCO ₃	50	90
Ca	mg/L		
Mg	mg/L		
Na	mg/L	0	200
HCO₃	ppm CaCO ₃		
Cl	mg/L	0	50
SO₄	mg/L	0	250
NO₃	mg/L	0	50
SiO₂	mg/L		
THM	µg/L	0	10
Fe	mg/L	0	0.1
Mn	mg/L	0	0.05
NH₄	mg/L	0	0.5
NO₂	mg/L	0	0.1
BrO₃	mg/L	0	0.01
H₂S	µ/L	0	5

Fonte: Adaptada do BAMFORTH (2016)

Outras características da água estão relacionadas ao seu uso em específico na cervejaria, como é o caso dos teores de cálcio e alcalinidade (BAMFORTH, 2016). O controle do pH é fundamental para o funcionamento adequado das enzimas no processo. Esse controle é realizado pelos íons de cálcio, que durante a mistura reagem com o tampão fosfato e influenciam o nível de pH.

Outra razão importante pela qual o cálcio é necessário na água de infusão é a precipitação do oxalato. É necessário ter cálcio suficiente na água para facilitar a precipitação de oxalato, o que, também é auxiliado por baixas temperaturas de

armazenamento. Nos dias de hoje, as cervejarias usualmente ajustam a composição da água de uso para se obter níveis de cálcio e alcalinidade desejados (HOWE, 2020).

Como já citado, as fontes de água para a fabricação de cerveja são as mais diversas. Essa variedade, as exigências de potabilidade da OMS e o requerimento de algumas características essenciais, demandam uma rigorosa análise dessas águas. Após a análise, dependendo da fonte que foi escolhida, faz-se necessário diferentes tratamentos para tornar a água ideal para uso (EUMANN; SCHAEBERLE, 2016).

Em algumas circunstâncias pode ser necessário apenas pré-tratamentos em outros casos, podem ser necessários tratamentos intensivos. Dependendo da origem da água se faz necessário tratamentos como:

- ✓ aeração - oxidação: remoção de odores;
- ✓ clarificação: adição de produtos químicos para aglomeração e coagulação de material em suspensão;
- ✓ filtração: remoção de sólidos;
- ✓ cloração: eliminação de microrganismos;
- ✓ desmineralização: remoção de sais em alto teor (BRIGIDO; NETO, 2009).

1.2.2 Malte

Malte é um produto que resulta da germinação artificial e posterior dessecação de cereais (malteação). Seu papel é servir como fonte principal de carboidratos, além de enzimas, proteínas, lipídeos e compostos aromáticos essenciais à produção da cerveja (LIMA; FILHO, 2011).

Entre os carboidratos presentes no malte podemos destacar a amilose e a amilopectina, que juntos formam o amido, como os principais constituintes do malte. Outros carboidratos importantes são as pentosanas, xilanas e β -glucanas, que contribuem para a viscosidade da cerveja (BAMFORTH, 2016)

O cereal mais utilizado pela indústria cervejeira como malte é a cevada. Sua alta capacidade de maltagem e baixo valor econômico tornam o cereal mais atraente que cereais como trigo, arroz, milho, sorgo e aveia. Além disso, seu alto teor de amido, baixo teor de lipídios, presença de enzimas que auxiliam na produção do

mosto e, também, proteínas, que auxiliam na formação de espuma e equilíbrio coloidal do produto, fazem da cevada o cereal ideal para o processo (LIMA; FILHO, 2011).

Além da cevada, outros cereais maltados podem ser usados no processo de produção e algumas cervejas são produzidas até com cereais não maltados, mas isso requer equipamentos especializados, adição de enzimas em partes específicas do processo e um maior grau de processamento (HOWE, 2020).

A variedade de maltes é enorme e eles podem ser divididos em dois grupos, os maltes base e os maltes especiais. Os maltes base são os maltes que servirão como fontes de enzimas para o processo. Geralmente secados em temperaturas mais brandas, cerca de 65 °C, o que protege as enzimas essenciais ao processo. Os maltes base não apresentam coloração escura e possuem pouca influência nos aromas e sabores da cerveja (GOODE *et al.*, 2004). Já os maltes especiais são responsáveis por conferir cor, sabor, corpo e sensação na boca. Por serem secados a temperaturas elevadas, eles não possuem enzimas ativas essenciais ao processo cervejeiro (DAVIES, 2010).

Devido à grande influência que exercem no processo produtivo, algumas características importantes devem ser levadas em consideração na hora de escolher o malte, como: umidade, friabilidade, pH, poder diastático, concentração de nitrogênio total, concentração de nitrogênio solúvel, coloração, rendimento, concentração de beta-glucanos nos grãos. Especificar essas características diminui variações no processo. Além disso, o malte deve estar ausente de quaisquer contaminações por metais pesados, micotoxinas, pesticidas e *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) (HOWE, 2020).

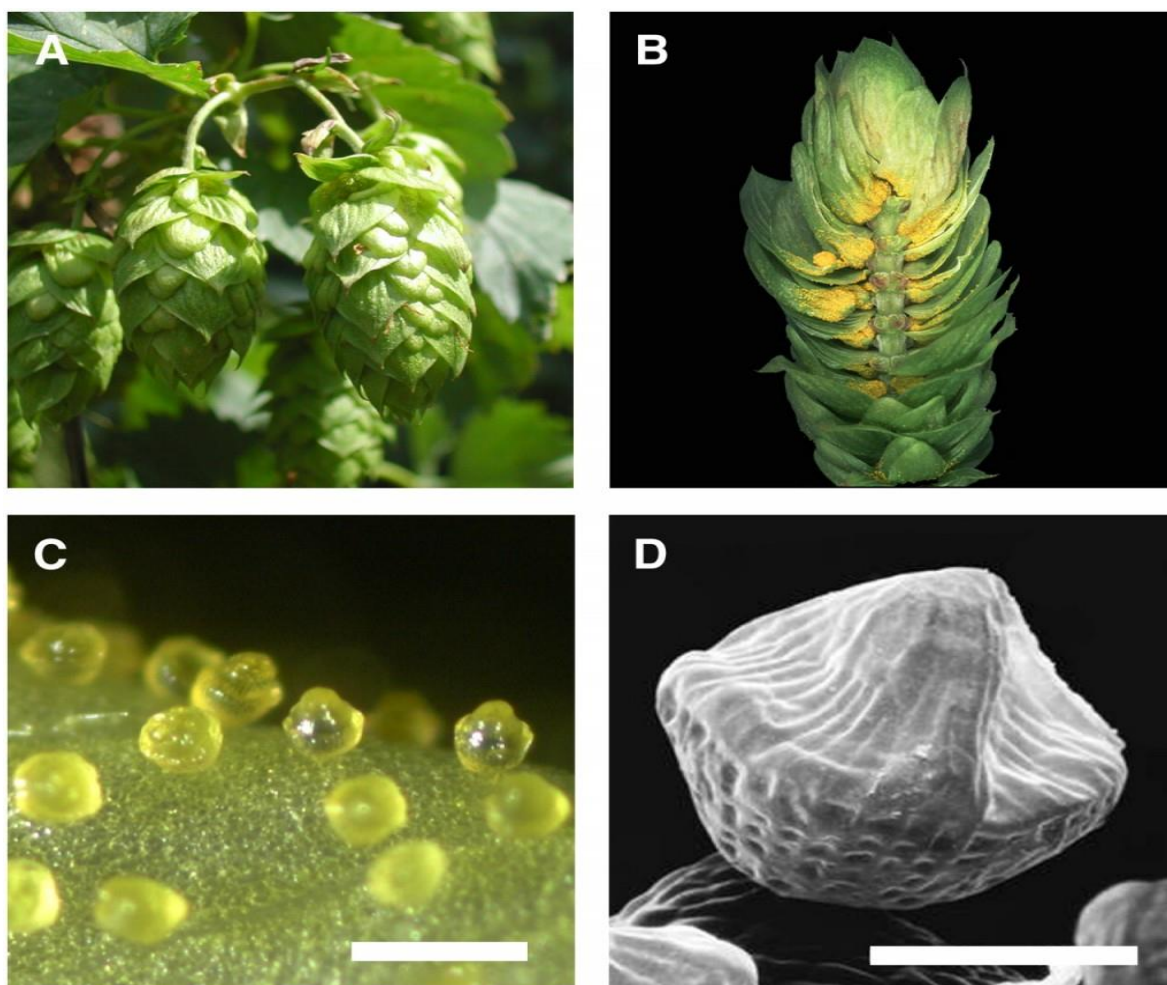
Um malte ruim vai lhe dar gravidades originais variadas, tempos de processamento estendidos na cervejaria, fermentações inconsistentes, problemas de filtração, nebulosidade e sabores estranhos (BAMFORTH, 2010).

1.2.3 Lúpulo

A *Humulus lupulus*, popularmente conhecida como lúpulo, pertence à família das *Canabaceas* e é nativa de regiões temperadas do hemisfério norte. Apresenta flores dioicas (masculinas e femininas), as masculinas em panículas frouxas e as femininas em espigas curtas, e frutos aquênicos (SMALL, 1978)

Embora o lúpulo se apresente como uma planta dioica, apenas as plantas femininas produzem os cones de lúpulo (Figura 2). Os cones abrigam a parte de maior importância para a indústria cervejeira, as glândulas amarelas de lupulina. Sua variedade de compostos químicos é responsável por contribuir com importantes características da cerveja (BAMFORTH, 2016).

Figura 2 - Morfologia dos cones de lúpulo e as glândulas de lupulina. (a) cones de lúpulo; (b) secção longitudinal do cone de lúpulo que mostra as glândulas de lupulina; (c) imagem de microscopia óptica das glândulas de lupulina maduras e (d) imagem de microscopia eletrônica de uma glândula de lupulina madura.



Fonte: *BIRCHLER (2019)*

A maior contribuição está relacionada à presença das resinas, principalmente a fração dos α -ácidos (também conhecidos como humulones), responsáveis pelo amargor característico do produto (HOWE, 2020). Os próprios α -ácidos não são amargos e somente quando convertidos em suas formas isomerizadas (iso- α -ácidos) durante o processo de fervura, tornam-se de gosto amargo

(BAMFORTH, 2016). Em algumas cervejas os α -ácidos não isomerizados podem ser encontrados em pequenas quantidades, contudo eles não contribuem para a amargura percebida, mesmo sendo utilizados como unidade de medida de amargor (IBU) (STEWART, 2013).

A outra parte significativa das resinas é a fração de ácidos- β (também conhecidos como lupulones). A quantidade de ácidos- β é normalmente menor que os α -ácidos e a proporção de α -ácidos para β depende da variedade da planta. Eles são largamente insolúveis e são normalmente perdidos durante a fervura (STEWART, 2013).

De igual importância em termos de sabor de cerveja são os sabores e aromas produzidos pelos óleos de lúpulo. Os compostos de óleo presentes no lúpulo são normalmente classificados em três grupos: terpenos, fração oxigenada e fração de enxofre (BAMFORTH, 2010). Os terpenos são quase insolúveis, mas pequenas quantidades de sabor ativo podem ser encontradas na cerveja final, particularmente no caso de cervejas de lúpulo seco ou quando as cervejas “green hop” são produzidas com adições de lúpulo fresco e não-amadurecido (BAMFORTH, 2016). A fração oxigenada apresenta-se mais solúveis que os terpenos, mas poucos desses compostos sobrevivem ao final do processo. Contudo há algumas evidências que sugerem a presença destes compostos podem ser sinérgicos em contribuir para o “hoppiness” da cerveja (SIEBERT, 1994). A fração de Enxofre é a mais problemática, já que tendem a ter impacto negativo no sabor da cerveja e, portanto, deve ser evitado (STEWART, 2013).

Os polifenóis também podem ter efeitos positivos no sabor da cerveja, bem como na estabilidade do sabor e em características menos bem-definidas como “sensação na boca” (FORSTER *et al.*, 1999).

Além da contribuição no sabor da cerveja, os componentes do lúpulo e suas formas isomerizadas são responsáveis por promover estabilidade de espuma (HUGHES, 2000), garantir resistência antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (GRANT, 1977) e fornecer atividade antioxidante ao produto final (BUGGEY, 2001).

O lúpulo pode ser comercializado na forma de flores secas (*in natura*), *pellets* ou em extratos, podendo tradicionalmente ser classificado como lúpulos aromáticos e de amargor conforme suas características predominantes (SEIDL, 2003).

1.2.4 Levedura

As leveduras são fungos unicelulares que se multiplicam rapidamente e realizam respiração anaeróbica ou fermentação, sendo amplamente utilizados na produção de pães e bebidas alcoólicas (BOULTON, 2020).

No processo cervejeiro, a levedura é o insumo mais importante, tendo o objetivo de metabolizar consistentemente os componentes do mosto em etanol, dióxido de (CO₂) e outros produtos de fermentação, a fim de produzir cerveja com qualidade e estabilidade satisfatórias. Além do etanol e do dióxido de carbono, outros compostos produzidos em concentrações equilibradas, como diacetil, sulfeto de hidrogênio e o dimetil sulfeto, contribuem para a formulação do produto final, já que influenciam diretamente nos seus sabores e aromas (MORADO, 2009; KOBAYASHI *et al*, 2008; MOURET *et al*, 2015).

As leveduras do gênero *Saccharomyces* tendem a dominar o processo fermentativo cervejeiro. Essa levedura é capaz de fermentar sacarose, glicose frutose, galactose, manose e maltotriose, ou seja, uma grande diversidade de açúcares, o que faz dela um microrganismo ideal para o processo (WYLER, 2013). Dentre as espécies mais utilizadas temos a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces pastorianus*. Ambas possuem variedades (linhagens), cada qual com características únicas que geram a grande diversidade de cervejas disponíveis hoje no mercado.

As cervejas do tipo "Lager" são produzidas por *S. pastorianus*, cepas que apresentando fermentação profunda (baixa), com faixa de temperatura ideal entre 7 e 15° C. As cervejas do tipo "Ale" são produzidas por *S. cerevisiae*, cepas que apresentam fermentação superficial (alta), com faixa de temperatura ideal entre 15 e 22° C (OLIVEIRA, 2011; BOULTON, 2020).

Um outro tipo de cerveja que vem ganhando destaque, embora sejam produzidas há muito tempo, são as cervejas "Sour". A fermentação das cervejas Sour ocorre pela ação de leveduras selvagens (não - *Saccharomyces*) que podem estar ou não em consorcio com bactérias, e o processo fermentativo pode ocorrer de forma espontânea ou controlada (TONSMEIRE, 2014). Um estilo bastante conhecido de cervejas Sour são as tradicionais Lambics, cervejas belgas produzidas por fermentação espontânea. Outro exemplo de estilo de cerveja tipo Sour é a Catarina

Sour, o primeiro estilo de cerveja brasileiro aceito pelo *Beer Judge Certificate Program* (BJCP).

As leveduras não-*Saccharomyces* começaram a ser utilizadas de forma domesticada pela necessidade de inovação do mercado e hoje são responsáveis por cervejas com novas características sensoriais (MEYBOM, 2019).

1.2.5 Adjuntos

Adjuntos de fabricação de cerveja são outros materiais além da cevada maltada que trazem fontes de carboidratos e proteínas no mosto (BAMFHORD, 2016).

De acordo com o Decreto N° 6.871 de 04 de junho de 2009, que regulamento a Lei n° 8.918 de 14 de julho de 1994, no Brasil entende-se por adjuntos cervejeiros as matérias primas que substituam parcialmente o malte ou o extrato de malte, na elaboração da cerveja. Seu emprego não poderá, em seu conjunto, ser superior a 45% em relação ao extrato primitivo.

Embora o material adjunto possa derivar de qualquer fonte de carboidratos, os cinco cereais principais que são atualmente utilizados como base pelo setor são a cevada, milho, arroz, sorgo e trigo (BAMFHORD, 2016).

Enquanto o uso das fontes tradicionais adjuntas na fabricação de cerveja já está muito bem estabelecido, existem muitas outras fontes de carboidratos que estão sendo estudadas (beterraba sacarina, açúcar cana, batata, painço, aveia, centeio, mandioca, grão-de-bico, feijão mungo, quinoa, trigo sarraceno, amaranto, soja, banana, mel e leite) (HOWE, 2020). Alguns destes são já utilizados na fabricação comercial, enquanto outros, a partir de sua maquiagem e arquitetura, parecem ter potencial para incorporação como adjuntos (BAMFHORD, 2016).

1.3 Processo Cervejeiro

A fabricação de cerveja foi um dos primeiros processos biotecnológicos a ser escalonado para fins comerciais e tornou-se um dos primeiros a ser desenvolvido a partir de um ofício. Sua produção é um processo unitário, podendo ser dividida em etapas distintas, mas relacionadas, interligadas (STEWART, 2013).

1.3.1 Malteação

O objetivo da maltagem é desenvolver um espectro de enzimas que hidrolisam os constituintes do malte de cevada para desenvolver um extrato fermentescível chamado mosto. O processo é dividido em três etapas: maceração, germinação e secagem.

Na maceração, o grão de cevada ou outro cereal é imerso em água. O aumento de umidade do grão cria um ambiente propício à germinação, processo que objetiva desenvolver e ativar enzimas. Nessa etapa há a intensa ação da giberelina, hormônio responsável por ativar enzimas como as α -amilases, beta-amilases, β -glucanases e proteases, responsáveis pela interconversão de dezenas de compostos (carboidratos, proteínas e lipídeos) (SISSONS *et al.*, 1993). As condições de temperatura, umidade e aeração da germinação são controladas e o processo é interrompido tão logo o grão tenha iniciado o processo de criação de uma nova planta, o "malte verde". Essa interrupção ocorre através do processo de secagem do grão (HOWE, 2020).

Na secagem, o "malte verde", que agora possui cerca de 45% de umidade deve ser seco de modo a preservar seu sistema enzimático. A secagem se faz a temperaturas que variam de 20°C a 100°C de acordo com a coloração desejada ao grão (claro ou escuro). Contudo, deve-se ressaltar que quanto maior a temperatura de secagem, maior será a perda enzimática do grão, o que afeta o processo de produção da cerveja (PICCINI; MORESCO; MUNHOS, 2002; AMBEV, 2012)

Às vezes, o malte é usado ainda "verde", ou seja, não seco e não queimado. Embora o malte feito de cevada seja de longe o mais importante, ele também é feito de trigo, centeio, aveia, triticale, sorgo, milho e arroz (STEWART, 2013).

1.3.2 Mostura (brassagem)

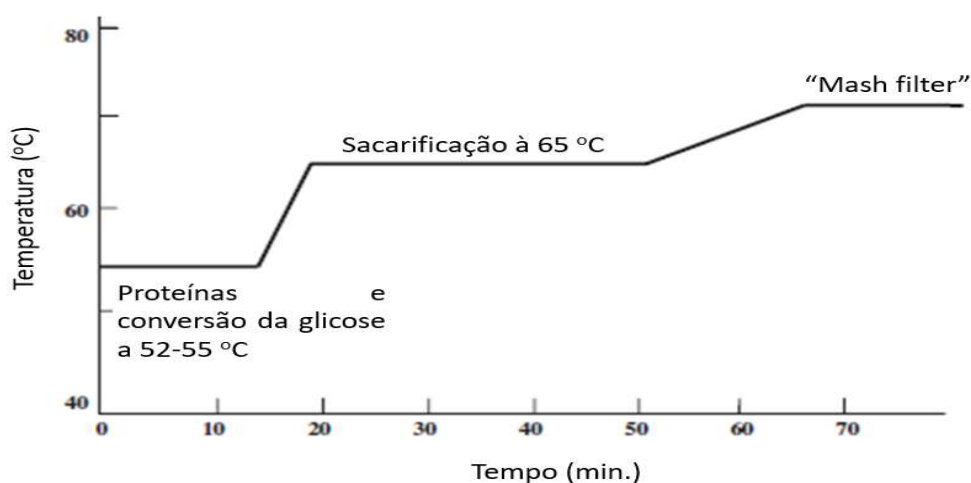
O objetivo principal dessa etapa é a quebra de carboidratos complexos como amido, amilose, amilopectina e beta glucanos (todos não fermentescíveis) em carboidratos simples como glucose e maltose (fermentescíveis). A fração fermentescível será metabolizada pelas leveduras em gás carbônico e etanol e a fração não fermentescível restante contribuirá para o corpo da cerveja (WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

Antes da mostura, os grãos passam por um processo de moagem. A ideia de moagem do grão consiste em quebrar a casca e liberar o endosperma do grão de modo que a casca fique o mais preservada possível, pois participará do processo natural de filtragem do mosto, e o endosperma o mais fragmentado possível (AMBEV, 2012).

Algumas das características finais da cerveja estão diretamente relacionadas à fragmentação do grão. Uma moagem muito fina provocaria uma maior degradação da casca e conseqüentemente uma maior remoção de taninos no processo de mostura, o que leva ao sabor adstringente à cerveja e prejudicaria o processo de filtragem natural do mosto. Porém, se a moagem for muito grossa, a eficiência de conversão do amido é reduzida e conseqüentemente a quantidade de cerveja também (AMBEV, 2012).

Depois de moído o grão é umedecido para estimular a atividade enzimática que hidrolisa o amido em açúcares fermentescíveis, as proteínas em peptídeos e aminoácidos e os lipídios em ácidos graxos livres e esteróis. Devido a diversidade de enzimas atuantes no processo, a mistura de grãos e água é submetida a períodos de aquecimento e repouso (Gráfico 4) com temperaturas controladas para promover condições adequadas à ação de cada enzima (STEWART, 2013).

Gráfico 4 - Perfil de temperatura de um programa típico de infusão.



Fonte: Adaptada de STEWART (2013)

A escolha do programa de temperaturas a ser aplicado durante a atuação enzimática depende da composição e do tipo de cerveja desejada (Tabela 3), definindo quanto de açúcares fermentescíveis se deseja para o processo de fermentação ou do quanto de substâncias proteicas de alta massa molecular se almeja para a formação do corpo da cerveja e consistência da espuma (SENAI, 1997).

Tabela 3 - Especificações do mosto de estilos de cerveja variados.

Parâmetros	<i>Pilsen</i>	<i>Pale Lager</i>	<i>Export</i>	<i>Dark Beer</i>	<i>Wheat Beer (Pale)</i>
Extrato original (%)	11,3 - 12,0	10,5 - 12,5	12,5 - 13,5	11,5 - 11,8	11,0 - 12,0
Grau de fermentação final (%)	84,0 - 85,0	81,0 - 82,5	81,0 - 84,0	78,0 - 81,0	80,0 - 82,0
pH	5,2 - 5,4	5,4 - 5,6	5,4 - 5,6	5,4 - 5,7	5,2 - 5,4
Cor do mosto (EBC)	7 - 10	7 - 15	10 - 15	50 - 100	10 - 20
Amargor (EBC)	25 - 45	15 - 30	25 - 35	30 - 45	12 - 18
Nitrogênio total (ppm)	800 - 1000	800 - 1000	800 - 1000	800 - 1000	1000 - 1200
Aminoácidos livres					
FAN (ppm)	200 - 250	200 - 250	200 - 250	200 - 300	200 - 300

Fonte: Adaptada de BAMFORTH (2016)

Após a hidrólise do amido é necessária a retirada do bagaço, massa resultante da aglutinação da casca com os resíduos do processo, podendo esta etapa ser realizada por sedimentação natural e efetuada em equipamento provido de fundo falso do tipo peneira, onde o líquido passa através da camada de cascas do malte depositadas (etapa de filtração, também denominada clarificação). Posteriormente é feita a lavagem destas cascas por passagem de água aquecida nas próprias peneiras de coleta ou em filtros prensas (RUSSEL; STEWART, 1995; MARTINS, 1991).

1.3.3 Lupulagem e fervura

Após a filtração, o mosto doce é fervido com adição de lúpulo. A ebulição é necessária para isomerizar os α -ácidos do lúpulo (ácidos de lúpulo isomerizados são amargos enquanto os ácidos não isomerizados não são). A fervura dura entre 15 e 120 minutos, dependendo de fatores como intensidade e volume de água. Quanto maior o tempo da ebulição, mais amarga a cerveja será. Lúpulos

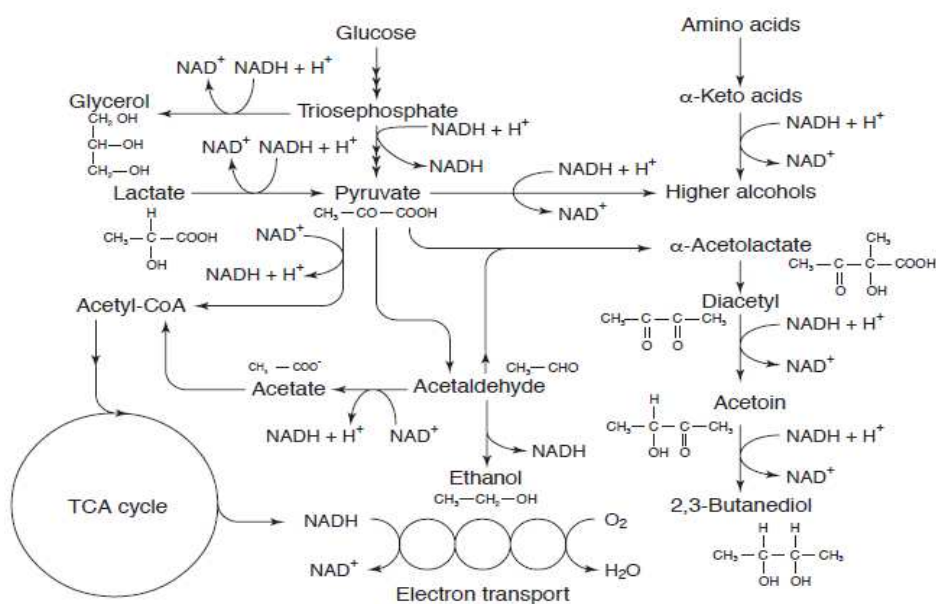
de amargor são fervidos no início durante uma hora, e os de aroma são fervidos no fim (HOWE, 2020).

Além da isomerização dos ácidos do lúpulo, a fervura do mosto se faz necessária para remover compostos voláteis indesejados de malte e lúpulo, para desnaturar e coagular proteínas, para fixar a composição do mosto e para encerrar toda a atividade enzimática e microbiológica que possa ter resistido ao processo de mosturação (BAMFORTH, 2016).

1.3.4. Fermentação

O processo fermentativo é o ponto central para a produção de qualquer bebida alcoólica. Durante o processo fermentativo as leveduras são responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, metabolizando os açúcares fermentescíveis para produzir álcool, gás carbônico, energia na forma de ATP e calor. Essa etapa ocorre no citoplasma celular e envolve doze reações que são catalisadas por enzimas específicas (Figura 3). As enzimas sofrem ações de diversos fatores (pH, temperatura, nutrientes, etc.) que podem estimular ou reprimir suas ações, afetando dessa forma o desempenho do processo fermentativo conduzido pelas leveduras (LIMA *et al.*, 2001).

FIGURA 3 – Metabolismo do mosto pelas leveduras



Fonte: BRIGGS *et al.*, (2004).

Ao término da fermentação alcoólica, o resultado é uma cerveja denominada “cerveja verde” a qual precisa passar por outro processo fermentativo, denominado fermentação secundária ou maturação. A maturação ocorre em temperatura baixa, entre 0 e 3 °C e pode levar semanas ou até meses, dependendo do tipo de cerveja que está sendo produzida (CEREDA, 1983). Segundo Dragone *et al.* (2010), a maturação tem como objetivo principal estabilizar o diacetil, composto formado na fermentação primária; iniciar a clarificação da cerveja pela sedimentação de células de leveduras e proteínas; propiciar a carbonatação (quando em baixa temperatura, o gás carbônico é absorvido pela cerveja) e melhorar o odor e sabor da cerveja, pela redução de diacetil, acetaldeído e ácido sulfídrico.

1.4 Inovações do mercado

O consumidor muda constantemente suas vontades, padrões e necessidades, o que gera mais dinamismo em qualquer mercado, influenciando a criação de novos segmentos e processos inovativos. E assim o mercado cervejeiro começou a se reinventar.

As principais inovações no mundo cervejeiro estão relacionadas ao processo produtivo, com o investimento em automação e na busca de matérias-primas e insumos que imprimam novas características, sempre buscando um produto final com alta qualidade e forte identidade (GUIA DA CERVEJA, 2019).

A automatização foi abraçada pelas cervejarias pela crescente necessidade de controlar todas as partes do processo e de avaliar todos os parâmetros do produto, sem expô-lo a ação de agentes externos. Novas tecnologias de automação do controle e validação do processo são utilizadas em sensores inteligentes que fazem medição em tempo real de parâmetros como temperatura, pressão, condutividade, turbidez, concentração de íons, etc (MEIJER *et al.*, 2014; SENSOR TRENDS, 2014; GEIER *et al.*, 2016; GONZALEZ-VIEJO *et al.*, 2017; WU *et al.*, 2021; MUTZ *et al.*, 2021).

Já no mundo das matérias-primas e insumos, as leveduras têm sido os maiores alvos de inovação. Historicamente, utiliza-se a *Saccharomyces cerevisiae* na produção da cerveja, mas na tentativa de criar bebidas com um maior diferencial, a procura por leveduras não-*Saccharomyces* aumentou. A utilização de leveduras "não

usuais" no processo fermentativo ajuda na incorporação de novos sabores e aromas (LARROQUE *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2021; CRAUWELS *et al.*, 2015), e possibilita, em alguns casos, que o processo ocorra em condições extremas, como baixos valores de pH, altas concentrações de álcool e limitação de oxigênio (LENTZ; HARRIS, 2015).

A busca por novos *flavors* e a necessidade de alterar características do processo e produto final abriram as portas do mercado cervejeiro não só para o uso de novos microrganismos, mais também para o uso de microrganismos modificados geneticamente. Já é possível encontrar inúmeras cepas de leveduras modificadas disponíveis para compra, todas com o intuito de acelerar a produção ou aumentar a quantidade de álcool produzido ou atribuir novas características organolépticas (BRITO, 2003; GIANNAKON *et al.*, 2021).

Os aditivos também têm ganhado bastante destaque na busca pela produção de um produto de excelência. A utilização de enzimas e outros compostos podem: melhorar a estabilidade da espuma, característica de extrema importância no aprisionamento de aromas e retardo na oxidação da bebida (CIMINI; MORESI, 2018; ZUPPARDO, 2010); produzir cervejas cevadas sem glúten (GUERDRUM; BAMFORTH, 2012; VAN LANDSCHOOT, 2011); eliminar características aromáticas não desejadas (HOLT *et al.*, 2018) e até produzir bebidas de caráter funcional (MANGAN *et al.*, 2017).

É cada vez mais comum vermos no mercado cervejas aditivadas com produtos naturais. A adição de flores, frutos, raízes, cascas de plantas entre outros vêm adicionando características não apenas sensoriais à bebida, mais também funcionais. Cervejas com quantidades significativas de terpenoides, flavonoides, polifenóis e antraquinona exibem alta atividade antioxidante, inibem o crescimento de microrganismos e diminuem a alteração de características como acidez e cor (TAMJIDI *et al.*, 2017; MANGAN *et al.* 2016; HORINCAR; APODI; RPEANU, 2019; ABELLÁN *et al.*, 2021).

A utilização de "Ingredientes opcionais" e/ou "Aditivos" nas cervejas, seja para conferir novos aromas ou para alterar suas propriedades, contraria o que é preconizado pela Lei de Pureza Alemã, que estabelece que apenas quatro ingredientes podem ser usados na produção de cerveja: água, malte, lúpulo e levedura. Entretanto, cada país tem uma legislação específica acerca da produção de

bebidas e embora a Escola Alemã ainda tenha muita influência no mundo da cerveja, o uso de novos ingredientes é uma realidade em todo o mundo (BAMFORTH, 2020).

A Legislação Brasileira permite, além da água, do malte, do lúpulo e da levedura, a utilização de uma diversidade de outras substâncias na produção de cerveja (BRASIL, 2019). Muitos deles são aditivos, que conservam ou modificam as características físico-químicas, biológicas ou sensoriais da bebida, ou ingredientes opcionais que agregam complexidade e sabor.

A busca incessante por novos aromas e sabores, principalmente com a incorporação de “ingredientes opcionais”, encontrou no mercado de alimentação natural e saudável um grande aliado, ampliando assim as possibilidades de ingredientes utilizados no processo e conseqüentemente as novas características atribuídas às cervejas (OZDAL, YOLCI-OMEROGLU, TAMER, 2020).

A adição de frutas tropicais, com propriedades funcionais e ricas em vitaminas, vem ganhando destaque em algumas produções científicas (ZAPATA et al., 2019; SOCCOL; DE CARVALHO; MONTEIRO, 2019; DE LUNA FREIRE *et al.*, 2019; GABAN; PEREIRA; NETO, 2019) e industriais (Figura 4). Inúmeros estudos relatam atividades antioxidante, antibacteriana e contra a obesidade, com o uso de frutas, além do fornecimento de novos aromas agradáveis ao público. Especiarias e ervas e uma infinidade de outros ingredientes, como gengibre, hortelã, marcela, erva-mate, berinjela e flor de brócolis, também são utilizadas na introdução de características funcionais e novos aromas às cervejas (ABELLÁN *et al.*, 2021; HORINCAR; APODI; RPEANU, 2019; TOZETTO, 2017; DIAS; DIAS, 2016; SOCCOL, 2017).

Figura 4 - Cervejas com adição de frutas brasileiras. Nassau - caju; Rosalia - frutas vermelhas brasileiras (grumixama, amora do mato e cereja do rio grande); Murica - graviola; Eugênia - uvaia.



Fonte: <https://www.embalagemmarca.com.br/2017/06/colorado-lanca- cervejas-com-frutas-brasileiras/>

A utilização de “ingredientes opcionais” tem aumentado o número de patentes depositadas no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (Tabela 4). Os relatórios das patentes descrevem novas cervejas com características de refrescância (DIAS; DIAS, 2016); propriedades antioxidantes (SOCCOL; DE CARVALHO; MONTEIRO, 2019; DE LUNA FREIRE *et al.*, 2019; SOCCOL, 2017), efeitos nutracêuticos (SANTOS DE LIMA, 2015; LIMA, 2013); ricas em proteínas e até cervejas energéticas (SILVA, 2015).

Tabela 4 - Lista de alguns pedidos de patentes relacionadas à aditivos cervejeiros depositados no INPI. Pesquisa foi realizada em ferramenta avançada utilizando como palavras-chave "cerveja" ou "beer" no título ou no resumo da patente.

Pedido	Data do Depósito	Título da patente	IPC
BR 10 2019 022376 6 A2	25/10/2019	PRODUÇÃO DE CERVEJA DE TRIGO COM ADIÇÃO DE POLPA DE ABACAXI E HORTELÃ	C12C 12/00
BR 10 2019 022306 5 A2	24/10/2019	FORMULAÇÃO DE CERVEJA DE LICURI (SYAGRUS CORONATA) E PROCESSO DE OBTENÇÃO	C12C 12/00
BR 10 2019 004492 6 A2	07/03/2019	PROCESSO DE ADIÇÃO DE EXTRATO DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA EM DIFERENTES ETAPAS DA PRODUÇÃO DE CERVEJA ENRIQUECIDA COM OS BIOATIVOS PRESENTES NO EXTRATO DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA.	C12C 12/00
BR 10 2018 076151 0 A2	17/12/2018	CERVEJA E FERMENTADO ALCOÓLICO A BASE DE MALTE ENRIQUECIDOS COM BIOATIVOS PRESENTES NA PITANGA (EUGENIA UNIFLORA L.)	C12C 12/00
BR 10 2018 076153 6 A2	17/12/2018	CERVEJA E FERMENTADO ALCOÓLICO A BASE DE MALTE COM ADIÇÃO DE RIBOFLAVINA E EFEITO DE FLUORESCÊNCIA EM PRESENÇA DE ILUMINAÇÃO ULTRAVIOLETA	C12C 12/00
BR 10 2018 076153 8 A2	17/12/2018	CERVEJA E FERMENTADO ALCOÓLICO A BASE DE MALTE ENRIQUECIDOS COM BIOATIVOS PRESENTES NA ROMÃ (PUNICA GRANATUM L.)	C12C 12/00
BR 10 2018 007271 4 A2	11/04/2018	PROCESSO PRODUTIVO DE CERVEJA COM MANGABA	C12C 12/00
BR 10 2017 028662 2 A2	15/12/2017	CERVEJA DE CAMU-CAMU (MYRCIARIA DÚBIA)	C12C 12/00
BR 10 2017 024450 4 A2	14/11/2017	PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA COM ADIÇÃO DE GRAVIOLA	C12C 12/00
BR 10 2017 001261 1 A2	20/01/2017	CERVEJA ADICIONADA DE CASCA DE LARANJA (CITRUS SINENSIS) E PEDÚNCULO DE CAJU (ANACARDIUM ORCIDENALE)	C12C 12/00
BR 10 2016 023777 7	13/10/2016	PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA COM PROPRIEDADES FUNCIONAIS, UTILIZANDO ARROZ PIGMENTADO BIODINÂMICO	C12C 7/047
BR 10 2016 006931 9	29/03/2016	PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA TIPO CERVEJA A BASE DE MALTE E EXTRATO SOLÚVEL DE MACELA (ACHYROCLINE SATUREIODES)	C12C 5/02
BR 10 2015 031953 3	18/12/2015	PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA TIPO CERVEJA A BASE DE MALTE E EXTRATO SOLÚVEL DE CARQUEJA	C12C 12/00
BR 10 2015 031986 0	18/12/2015	PROCESSO DE MATURAÇÃO DE CERVEJA COM UTILIZAÇÃO DE CAFÉ	C12C 5/02
BR 10 2015 031078 1	11/12/2015	PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA TIPO CERVEJA A BASE DE MALTE E EXTRATO SOLÚVEL DE CHAPÉU-DE-COURO (ECHINODORUS MACROPHYLLUM; ECHINODORUS GRANDIFLORUS)	C12C 12/00
BR 10 2014 031594 2	17/12/2014	PRODUÇÃO DE BEBIDA FERMENTADA TIPO CERVEJA A BASE DE MALTE E EXTRATO SOLÚVEL DE ILEX PARAGUARIENSIS	C12C 12/00
BR 10 2014 030280 8	03/12/2014	PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CERVEJA COM SABOR HORTELÃ E PRODUTO RESULTANTE	C12C 5/02
BR 10 2013 029923 5	21/11/2013	CERVEJA ENERGÉTICA COM ÁLCOOL OU SEM ÁLCOOL, ENRIQUECIDA COM CAFEÍNA, TAURINA E GUARANÁ MICROENCAPSULADOS	C12C 12/00
BR 10 2013 029464 0	14/11/2013	CERVEJA ENRIQUECIDA COM SUCO OU EXTRATO DE BLUEBERRY, QUE COMBATE A OBESIDADE E PROMOVE A SAÚDE DO CORAÇÃO	C12C 5/02

Fonte: Autor (2021).

A cerveja enriquecida com ômega-3 promete diminuir os níveis de triglicerídeos no sangue, diminuir a pressão sanguínea e prevenir a irregularidade dos batimentos cardíacos (LIMA, 2013). Já a utilização da planta pau-tenente (*Quassia amara L*) proporciona notas de amargor à cerveja, sendo uma opção para a substituição de lúpulos de amargor no processo (PEIXOTO, 2015).

Todos esses trabalhos e depósitos de patentes só corroboram o crescimento do mercado cervejeiro e sua busca incessantemente por bebidas com novos sabores e aromas e que apresentem características funcionais ou nutracêuticas.

1.5 Uso e benefícios das microalgas como aditivos alimentares

A preocupação com uma alimentação saudável e a busca pelo corpo perfeito tem levado à um crescimento do mercado de alimentação ligado à saúde e ao bem-estar. Mudanças de padrões de consumo para aderir a um estio de vida mais saudável tem impulsionado o mercado, que só em 2016, no Brasil, movimentou 93,6 bilhões de reais, sendo responsável pelo quarto maior mercado do mundo (SEBRAE, 2017).

Buscando inovar nesse segmento, o setor tem investido na pesquisa de alimentos nutricionalmente ricos e provenientes de fontes naturais, levando ao público produtos com atividades funcionais atraentes ao mercado em expansão (SEBRAE, 2017).

A introdução de novos alimentos no mercado é considerada de extrema importância a fim de entender as demandas atuais dos consumidores. Dentre os alimentos que vêm sendo considerados inovadores na área, vale destacar as microalgas, uma fonte promissora para novos alimentos e produtos alimentares funcionais (IGUAL *et al.*, 2021).

As microalgas são organismos unicelulares e fotossintéticos, localizando-se fundamentalmente em meios marinhos, águas doces, águas residuais e solos úmidos, que só podem ser observadas ao microscópio (DERNER *et al.*, 2006). Elas podem tolerar uma ampla faixa de temperaturas, salinidades e valores de pH; diferentes intensidades de luz; e condições em reservatórios ou desertos e podem crescer sozinhas ou em simbiose com outros organismos (KHAN, 2018).

Sua biomassa é um fornecedor natural de compostos ativos, como carotenoides (astaxantina, betacaroteno, luteína, cantaxantina etc.), ficobilinas, ácidos graxos poliinsaturados (ácido araquidônico - ARA, ácido eicosapentaenóico - EPA e ácido decosaheptaenóico – DHA), polissacarídeos, vitaminas e esteróis (GOUVEIA *et al*, 2002; GOUVEIA *et al*, 1996; GILL; VALIVETY, 1997). Esse valor nutricional tem promovido a sua utilização como suplemento proteico (Tabela 5) e como nutracêutico.

As espécies mais utilizadas comercialmente são a *Chlorella* e a *Arthrospira* (*Spirulina*); além dessas, a *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Schizochytrium*, *Scenedesmus*, *Aphanizomenon*, *Odontella* e *Porfirídio* estão ganhando aceitação no mercado de alimentos saudáveis (RAJA *et al.*, 2008; WIKFORS; OHNO, 2001).

Tabela 5 - Avaliação nutricional de algumas microalgas comercializadas.

Microalga	Lipídeos [g/100g]	Fibras [g/100g]	Polissacarídeos [g/100g]	Proteínas [g/100g]	Empresa fornecedora
<i>C. vulgaris</i>	9	18	9	52	Roquette Klötze Algomed Chlorella
<i>A. patensis</i>	7	0	16	61	Earthrise Spirulina
<i>P. tricomutum</i>	13	14	18	40	Roquette Klötze*
<i>N. oceanica</i>	24	14	11	35	Allmicroalgae Allma, Portugal*

Fonte: Adaptado de NEUMAN *et al.* (2018)

Alguns estudos comprovam que a incorporação de biomassa de microalgas nos alimentos pode conferir a eles importantes efeitos terapêuticos, como antioxidante, anticancerígeno, antilipidêmico, e efeito protetor contra a diabetes e obesidade (FELLER *et al.*, 2018; ZAID; HAMMAD; SHARAF, 2015; HIRAHASHI *et al.*, 2002; KURD; SAMAVATI, 2015; PONCE *et al.*, 2010). Uma dieta rica em *Arthrospira*, segundo estudos, pode conferir ao organismo vários efeitos benéficos (Tabela 6), devido a diminuição de processo inflamatórios, diminuição de sintomas provocados pela rinite alérgica (coriza, irritação, congestão nasal), fortalecimento do sistema

imune e proteção do fígado e neurônios (AKAO *et al.*, 2009; PLAKIDA *et al.*, 2020; FERREIRA-HERMOSILO *et al.*, 2010).

Tabela 6 - Empresas, localização, microalgas cultivadas, seus produtos e a atividade biológica atribuída

Empresa	País	Microalga (gênero)	Produto	Aplicação
Market/Omegatech	EUA	<i>Cryptocodinium</i>	DHA	Desenvolvimento cerebral
Cyanotech	EUA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina	Tratamento da síndrome do Túnel do Carpo
Mera	EUA	<i>Haematococcus</i>	Astaxantina	Anti-inflamatório, tratamento de lesões musculares
OceanNutrition	Canadá	<i>Chlorella</i>	Extrato de carboidratos	Melhora da resposta imunológica, antigripal 3(anti-flu)
InnovaIG	França	<i>Odontella</i>	EPA	Anti-inflamatório
Pammol/Madaus	Áustria	<i>Spirulina</i>	Vitamina B12	Melhora da resposta imunológica
Nutrinova/Celanese	Alemanha	<i>Ulkenia</i>	DHA	Tratamento de doenças cerebrais e cardíacas

Fonte: Adaptado de PULZ e GROSS (2004).

A viabilidade dessas atividades biológicas é condicionada a fatores como a matriz alimentar, o tipo de processamento e interações com outras substâncias alimentares.

Microalgas com alto valor nutricional já estão sendo comercializadas na sua forma pura, como extratos, comprimidos ou cápsulas, ou como aditivos em vários produtos alimentares (Figura 5), como barras de chocolate, barras de cereais, bebidas, maionese vegana, macarrão, biscoitos e suplementos energéticos. Alguns trabalhos mostram ainda a sua utilização eficaz na preparação de *breadsticks*, biscoitos, barra de cereais, azeites e emulsões (IGUAL *et al.*, 2021; LEMES *et al.*, 2012; FRAGOSO, 2016; MORAIS; MIRANDA; COSTA, 2006; RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; ALAVI; GOLMAKANI, 2017; GOUVEIA *et al.*, 2006).

Figura 5 – Preparações alimentícias desenvolvidas com a adição de microalgas, em sua totalidade ou em parte.



Fonte: Autor (2021).

A incorporação de microalgas em alimentos também tem ganhado destaque nas cozinhas de restaurantes da alta gastronomia, alguns dos quais possuem estrelas Michelin. A ficogastronomia veio suprir a crescente necessidade dos consumidores por inovação e atender a ânsia de alguns dos chefs por adicionar nos pratos seus ideais de sustentabilidade, etnia e autenticidade (PEREZ-LLORENS, 2020).

Já está claro que as microalgas são o presente e o futuro da alimentação humana. Mas mesmo com todo o apelo gastronômico e nutricional que possuem, ainda há muita dificuldade quando se fala da incorporação de microalgas em alimentos. Seu cheiro forte, a cor verde escura e sua consistência em pó limitam a sua utilização em alimentos convencionais (ALMEIDA *et al*, 2017).

1.6 *Chlorella vulgaris*

A *C. vulgaris* é uma microalga verde unicelular encontrada em muitos sistemas aquáticos. As espécies do seu gênero possuem grande importância a nível econômico e comercial devido a facilidade em seu cultivo e seu alto valor nutricional.

Devido à sua abundância e efeitos positivos para a saúde, a *Chlorella* é considerada um alimento funcional e uma fonte de nutrientes em muitas áreas, sendo amplamente vendido como alimento saudável, suplemento alimentar e nutracêutico (BISHOP; ZUBERGH, 2012). Isso porque ela apresenta uma composição rica em proteínas, carotenóides (α e β -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina), lípideos (ω -3 e ω -6, ácido oleico, ácido palmítico e ácido linoleico), fibras, vitaminas (principalmente B12) e minerais (GOUVEIA *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 2010; LORDAN; ROSS; STANTON, 2011; MORAES *et al.*, 2015).

Atualmente, o Japão é o líder mundial em consumo de *Chlorella*, utilizando-a principalmente para tratamento médico, devido seus agentes promotores de saúde. As propriedades atribuídas à esta microalga incluem entre outros, efeitos anti-inflamatórios, efeitos desintoxicantes e anticancerígenos (HIDALGO-LUCAS *et al.*, 2016; UCHIKAWA, 2011; SEDIGHI *et al.*, 2016; EL-FAYOUMY *et al.*, 2021). Os benefícios podem estar relacionados a ingestão total da célula ou de seus compostos bioativos, como fenóis e carotenoides com atividade antioxidante e antiproliferativa (PANAHI *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2017) bem como polissacarídeos com efeitos anti-inflamatórios (GUZMAN *et al.*, 2003; BORKORIKOVÁ *et al.*, 2019). Além disso, também foi demonstrado que uma dieta rica em *C. vulgaris* pode trazer melhoria dos níveis de lipídios séricos, aumento nos níveis de vitamina B12 e carotenoides (CHEN *et al.*, 2019; MERCHANT; PHILLIPS; UDANI, 2015; RYU *et al.*, 2014). Na tabela 7, estão relacionadas algumas dos efeitos benéficos atribuídos à espécie.

Tabela 7 – Algumas das atividades biológicas relacionadas à espécie *Chlorella vulgaris*.

	ATIVIDADE BIOLÓGICA	REFERÊNCIA
Suplementação com biomassa e/ou aplicação de extratos aquosos	Imunoestimulante natural	PLAKIDA <i>et al.</i> , 2020; SABERI <i>et al.</i> , 2017
	Efeito antiproliferativo	ZHANG <i>et al.</i> , 2017; CHA; KUO; LEE, 2008; WU <i>et al.</i> , 2005
	Propriedade moduladora adipogênica em pré-adipócitos	ILAVENIL <i>et al.</i> , 2016
	Antimicrobiana	SEDIGHI <i>et al.</i> , 2016

Continuação

Tabela 7 – Algumas das atividades biológicas relacionadas à espécie *Chlorella vulgaris*

	Anti câncer	EL-FAYOUMY et al., 2021; SEDIGHI et al., 2016; WANG et al., 2010
	Controle dos níveis de glicose e colesterol no sangue	CHEN et al., 2019; KIM et al., 2016; RYU et al., 2014; KIM et al., 2009
	Anti-apoptótico em células de retina	KIM et al., 2014
Suplementação com biomassa e/ou aplicação de extratos aquosos	Anti-inflamatório	BARBORIKOVA et al., 2019; HIDALGO-LUCAS et al., 2016; GUZMAN et al., 2003
	Agente dietético antialérgico	BAE et al., 2013
	Aumento da vitalidade em pacientes com câncer	NOGUCHI et al., 2014
	Agente desintoxicante	UCHIKAWA, 2011; QIAN et al., 2009
	Atividade antioxidante	PANAHI et al., 2013; GOIRIS et al., 2012; LEE et al., 2003
	Efeito hepatoprotetor	EBRAHIMI-MAMEGHAMI et al., 2017; AZOCAR; DIAZ, 2013.
	Aumento dos níveis de vitamina B12	MERCHANT; PHILLIPS; UDANI, 2015
	Antihipertensivo	OSUKI et al., 2013; SANSAWA et al., 2006.

Fonte: Autor (2021)

A. C. vulgaris é uma das poucas microalgas que podem ser encontradas no mercado como suplemento ou aditivo alimentar, corante (depois de carotenogênese)

e emulsão alimentar (FERNANDES *et al.*, 2012). Esses produtos são vendidos de diferentes formas, como cápsulas, tabletes, extratos e pó.

A tabela 8 mostra a aplicação da *C. vulgaris* na obtenção de novos produtos ou como suplemento alimentar.

Tabela 8 - Produtos obtidos a partir de *Chlorella vulgaris* e suas aplicações.

	Produto	Aplicação	Referência
	Biomassa	Melhoria de propriedades reológicas da farinha de trigo	GRACA <i>et al.</i> , 2018
	Biomassa	Produção de biscoitos proteicos	BATISTA <i>et al.</i> , 2017
	Biomassa	Aumento da estabilidade oxidativa de azeites de oliva virgens	ALAVI <i>et al.</i> , 2017
	Biomassa	Fonte de ômega-3 e ômega-6 para vegetarianos	ORTIZ MONTOYA <i>et al.</i> , 2014
Biomassa	Biomassa	Suplementação de leite fermentados probióticos	BEHESHTIPOUR <i>et al.</i> , 2013
	Biomassa	Suplementação de grávidas com o intuito de melhorar a quantidade de carotenoides no leite materno no início da lactação	NAGAYAMA <i>et al.</i> , 2014
	Biomassa	Suplementação nutricional e sensorial de massas	FRADIQUE <i>et al.</i> , 2010
	Extrato	Suplementação de aa essenciais	MORRIS <i>et a.</i> , 2011.
Corantes e antioxidantes	Carotenóides	Corantes naturais de comidas Halal	OTHMAN <i>et al.</i> , 2017
Ácidos graxos	Óleos	Produção de óleo comestível em substituição ao azeite de oliva	HUANG <i>et al.</i> , 2016
Vitaminas	B ₁₂	Suplementação de vitamina B ₁₂ em veganos	WATANABE; BITO., 2017; BITO <i>et al.</i> , 2016

Fonte: Autor (2021)

Continuação

Tabela 8 - Produtos obtidos a partir de *Chlorella vulgaris* e suas aplicações.

Polímeros	Polissacarídeos	Fonte de antioxidantes naturais	CHEN <i>et al.</i> , 2016
	Proteínas	Proteínas de origem não-animal voltada para o mercado vegano	SMETANA <i>et al.</i> , 2017
	Proteínas	Substituição de emulsificantes comerciais	URSU <i>et al.</i> , 2014
Fibras	Fibras	Melhoria do funcionamento intestinal	MORRIS <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Autor (2019).

Além da rica composição nutricional, a *C. vulgaris* é um organismo Geralmente Reconhecido como Seguro (GRAS) pela FDA. Estudos a longo prazo não relataram reações alérgicas, toxicidade e nem efeitos negativos associados ao seu consumo (AZLAN *et al.*, 2020). Sua ingestão recomendada é múltipla, mas geralmente na faixa de 2 a 6 g por dia (POWELL *et al.*, 1961). Por ser considerada uma fonte alimentar segura, ela não precisa passar por um processo de avaliação da segurança alimentar (Regulamento EC Nº 258/97 Europeu) relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares introduzidos na alimentação humana, o que facilita sua comercialização e introdução na formulação de novos alimentos.

Sendo assim, diante da segurança alimentar e da gama de benefícios relacionados à sua ingestão, além da rica diversidade de aplicações alimentares, a *C. vulgaris* foi escolhida como “ingrediente opcional” para a produção de uma nova cerveja.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Desenvolver uma cerveja artesanal de alta fermentação utilizando como aditivo o extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*.

2.2. Específicos

- ✓ Cultivar a microalga em fotobiorreator fechado de placa plana para a produção de biomassa microalgal;
- ✓ Realizar a análise elementar da biomassa microalgal;
- ✓ Preparar o extrato microalgal que será utilizado como aditivo;
- ✓ Fazer a análise fitoquímica do extrato;
- ✓ Formular e produzir a cerveja de alta fermentação (estilo APA – *American Pale Ale*) utilizando o extrato microalgal como aditivo;
- ✓ Avaliar as características físico-químicas da cerveja;
- ✓ Avaliar as atividades antioxidante da cerveja;
- ✓ Analisar a viabilidade de produção da cerveja.

3. MATERIAIS

3.1 Microalgas

As células da microalga *C. vulgaris* utilizadas neste trabalho foram obtidas do Laboratório de Desenvolvimento de Produtos e Processos (LDPP-PADETEC). A espécie usada foi devidamente cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SisGen (No. processo ADA415C).

3.2 Meios de cultura e reagentes

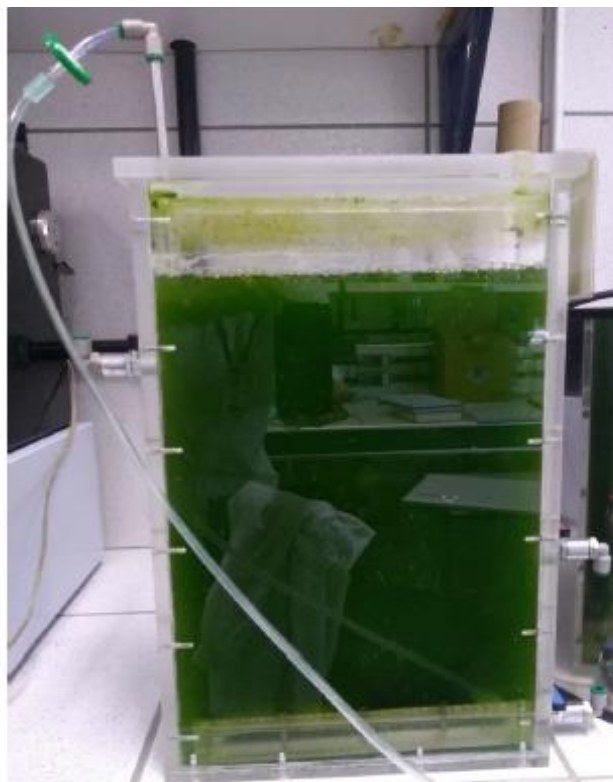
Os principais reagentes e meios empregados na pesquisa foram: meio WC; meio NPK; albumina sérica bovina (BSA); *Coomassie Brilliant Blue R-250*; acrilamida; bis-acrilamida; 2-mercaptoetanol; bromofenol; 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl; L-ácido ascórbico; dodecil sulfato de sódio (SDS); trizma-base. E outros reagentes de grau analítico como ácido clorídrico, cloreto de sódio, etanol, metanol, ácido acético, metabisulfito de potássio e iso-octano.

4. MÉTODOS

4.1 Cultivo *in door* da microalga *Chlorella vulgaris* para produção de biomassa.

Inicialmente as células de *C. vulgares* foram pré-inoculadas, sob condições assépticas, em um fotobiorreator cilíndrico contendo 100 mL de meio WC com pH ajustado para 7,0. Esse fotobiorreator foi mantido por 4 dias em uma câmara de crescimento (B.O.D.) sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C), fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 4000 Lux e aeração estéril constante (mantida por aerador elétrico e filtros de 0,25 μm). Após esse período, o pré-inóculo (com uma densidade óptica a $690_{\text{nm}} = 0,8$) foi inoculado num fotobiorreator retangular de placa plana (Figura 6) contendo 4 L do meio de cultura contendo NPK (formulação 20:10:20 m/m/m) pH 7,0. A cultura foi mantida por 14 dias na plataforma de crescimento usando a temperatura de 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h, intensidade luminosa de 50.000 Lux e aeração estéril constante.

Figura 6 – Cultivo de microalga *Chlorella vulgaris* em fotobiorreator retangular de placa planar.



Fonte: Grupo de Biotecnologia Molecular e Estrutural (GBME)

4.2. Quantificação da biomassa por turbidimetria e contagem celular

Para acompanhamento do crescimento celular, as amostras foram coletadas periodicamente em condições assépticas. A quantificação foi calculada por meio da densidade óptica (690 nm), ou seja, análise de absorvância em espectrofotômetro UV-Vis (Amersham Biosciences®/Ultrospec 2100 pro) com auxílio de curva de calibração pré-determinada. Para a contagem celular utilizou-se um microscópio óptico modelo BIOVAL com auxílio de um hemacitômetro tipo câmara de Neubauer de 0,1 mm de profundidade (LOURENÇO, 2006). Os métodos de contagem e absorvância foram relacionados por meio de curva de calibração para acompanhamento do crescimento celular.

4.3. Coleta e processamento da biomassa microalgal

A cultura de microalgas foi coletada e concentrada por centrifugação a 4000 x g por 10 minutos, a temperatura ambiente (25 °C). A biomassa concentrada foi lavada com água destilada para remoção do meio de cultura através de quatro etapas alternadas de ressuspensão da biomassa em água e centrifugação conforme descrito anteriormente. A biomassa fresca foi pesada e submetida ao processo de liofilização. Após a liofilização, a biomassa foi pesada para o cálculo de rendimento e acondicionada para uso nas etapas posteriores.

4.4. Caracterização da biomassa microalgal

Com a biomassa liofilizada foram realizados ensaios de determinação de nitrogênio total e teor proteico, seguindo o método de micro Kjeldahl (MILLER, 1945). Após a determinação de nitrogênio, os lipídeos totais foram extraídos da biomassa através do método de Soxhlet. O teor de cinzas e umidade foi determinado gravimetricamente seguindo metodologia descrito na Farmacopéia Brasileira (1988) (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 2008), e então, a quantificação de carboidratos foi realizada pela diferença entre 100 da soma dos teores de umidade, cinzas, lipídeos totais e proteínas.

4.5. Preparo do extrato de microalgas

Inicialmente, a biomassa microalgal liofilizado (40 g) foi pesada em um tubo Falcon e dissolvida em 60 mL de água destilada e homogeneizada sob agitação. A mistura foi transferida para um cadinho e macerada vigorosamente por 10 min. A mistura foi submetida a três ciclos de congelamento a -20 °C e descongelamento. Por último, a mistura foi submetida ao processo de lise celular pelo método de ultrassonicação usando uma cuba sonicadora (Cristofoli, Brasil), com amplitude de 50-60 Hz, por 2 h utilizando 15 ciclos de 480 segundos. O extrato lisado, denominado extrato bruto (EB), foi transferido para um frasco de borossilicato e congelado para utilização nas etapas posteriores.

4.6. Dosagem de proteínas solúveis do extrato microalgal

A dosagem de proteínas solúveis do EBs foi realizada segundo o método de Bradford (1976). Para cada 100 µL de extrato, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Bradford. As misturas foram agitadas e deixadas em repouso por 10 minutos a 25 °C. Em seguida, foi determinada a absorbância a 595 nm, em espectrofotômetro. A concentração de proteínas foi calculada a partir de uma curva padrão obtida com albumina sérica bovina (BSA).

4.7 Análise eletroforética do extrato microalgal

A análise eletroforética do extrato microalgal foi realizada sob condições redutoras e desnaturantes (LAEMMLI, 1970). Foi utilizado um gel de aplicação de 3,5% de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e um gel de separação com 15 % de acrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M (pH 8,8) contendo SDS 1%. As corridas eletroforética foram realizadas a 25 mA e uma voltagem inicial de 100 V. As amostras foram preparadas em tampão de amostra (Tris-HCl 62,5 mM pH 8,3 contendo SDS 1%, β-mercaptoetanol 0,1%, sacarose e azul de bromofenol 1%): 5 µL do tampão de amostra p/ 25 µL. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 100 °C por 2 min e centrifugadas a 1000 rpm por 5 min à temperatura ambiente. Aplicou-se de 15 a 20 µL de amostra em cada poço do gel. Para fins de comparação, foi utilizado um marcador molecular *Low range* (6 – 66 kDa) no primeiro poço. As bandas proteicas foram coradas com *Coomassie Brilliant Blue R-250* a 0,05 %, preparado em uma solução de metanol: ácido acético: água (1:3,5:8, v/v/v).

4.8. Preparo da cerveja artesanal (estilo Ale) aditivada com microalgas

4.8.1. Moagem

Nesse processo foi adotado o método *all-grain*, no qual 7,6 Kg do malte Pilsen e 1,6 g do malte Caraamber foram moídos manualmente em moinho giratório, de modo que o interior dos grãos foi exposto, sem que a casca tenha sido totalmente triturada. O malte Caraamber, além de melhorar o paladar e estabilidade do sabor da cerveja, adiciona coloração avermelhada e confere notas de toffee, caramelo e pão, características do estilo American Pale Ale.

4.8.2. Mosturação

Inicialmente foram aquecidos 32 L de água mineral à 55 °C na panela de maturação. Em seguida os grãos moídos foram lentamente adicionados a água sob agitação constante com o auxílio da pá cervejeira. A temperatura baixou naturalmente até 50 °C, temperatura de ativação enzimática. Nessa temperatura o amido dos maltes começa a se solubilizar e enzimas, como as β -glucanases são ativadas. O mosto foi mantido nessa temperatura por 5 a 10 min. A temperatura do mosto foi elevada para 65 °C para o processo de sacarificação e mantida por 1 h, sendo agitado a cada 5 min para aumentar a ação das enzimas α -amilase e a β -amilase.

4.8.3. Teste do iodo

Com o auxílio de pipeta, 500 μ L iodo (2%) foram adicionados em dois poços da placa de toque. Em seguida, 500 μ L do mosto foi coletado e adicionado em um dos poços. Quanto mais semelhante for a cor do mosto c/ iodo em relação ao poço teste, melhor terá sido a conversão do amido e maltose (sacarificação) em açúcares fermentescíveis.

4.8.4. Encerramento da mosturação (Mash out)

Após o teste do iodo, o mosto foi aquecido por 15 min a 78 °C para a inativação enzimática, já que é necessário cessar a atividade das amilases após sua ação, impedindo que continuem a atuar durante a filtração do mosto.

4.8.5. Recirculação do mosto

Um aparato constituído por bomba elétrica, mangueiras e chuveiro foi usado para promover a recirculação do mosto por 10 min com o objetivo extrair o máximo de açúcares (maltose) que darão corpo a cerveja.

4.8.6. Transferência do mosto e Sparging

Após a recirculação, a torneira da panela de mosturação foi aberta e o mosto transferido para a panela de lupulagem e fervura. Nesta etapa a camada de grãos retidos na panela de brassagem foi lavada com 18 L de água pré-aquecida a 78 °C para o aproveitamento máximo dos açúcares extraídos. Esse processo é denominado de “Sparging”.

4.8.7. Lupulagem e adição do extrato de microalgas

Nesta etapa o mosto foi submetido à fervura para a adição dos lúpulos. Na medida que mosto foi aquecendo, a espuma formada na superfície da mostura foi sendo removida utilizando uma escumadeira. Depois que iniciar a fervura, o mosto foi mantido nessa condição por 60 min. Durante esse tempo, os lúpulos foram adicionados da seguinte forma:

- ✓ Adição de 20 g do lúpulo Nugget no início da fervura;
- ✓ Adição do 20 g do lúpulo Cascade e 20 g do lúpulo Chinook faltando 20 minutos para o final da fervura;
- ✓ Adição de 20 g do lúpulo Chinook faltando 10 minutos para o final da fervura;
- ✓ Adição de 20 g lúpulo Cascade e 40 mL de extrato lisado de microalgas ao final da fervura.

Faltando 15 min para o final da fervura também foram adicionados 2 tabletes do floculante *Whirlfloc T* (BSG Company) especialmente selecionado para precipitação das proteínas do trüb e clareamento da cerveja.

4.8.8. Concentração de sedimentos (Whirpool)

Após a lupulagem, o mosto foi mantido em repouso por 2 min. Com o mosto ainda aquecido foi feito o *Whirpool* (agitação orbital do mosto com uma pá cervejeira,

no sentido anti-horário para decantar os sedimentos no fundo da panela) por 5 min. Em seguida, o mosto foi mantido em repouso para a etapa de resfriamento.

4.8.9. Resfriamento e transferência do mosto para o fermentador

O mosto foi resfriado utilizando um sistema de bomba elétrica de circulação, mangueiras e chiller (local de circulação da água), que foi colocado dentro da panela de lupulagem. O mosto foi mantido nesse sistema até atingir temperaturas na faixa de 25 a 20 °C. Nesta etapa uma alíquota de 500 µL do mosto foi utilizada para medir a densidade original (DO). Após o resfriamento, o mosto foi transferido para o fermentador tubular de 50 L, previamente sanitizado com álcool 70% e metabissulfito de potássio 10%.

4.8.10 Ativação da levedura

Antes da etapa de fermentação, 23 g da levedura *S. cerevisiae* (SafALE™ US-05) foi submetida a hidratação em um volume 10 vezes seu próprio peso com água estéril ou com mosto a 25 °C. A mistura foi mantida sob agitação por até 30 minutos.

4.8.11 Inoculação, fermentação primária e maturação da cerveja

O volume total da levedura hidratada foi vagarosamente inoculado ao mosto contido no fermentador, que em seguida foi tampado e acoplado ao *airlock*. O fermentador foi mantido a 18 °C por 8 dias. Após 12, 24 e 48 horas, foi verificado a presença de borbulhas de gás no *airlock* para confirmar a fermentação. Após 8 dias de fermentação, a cerveja foi assepticamente transferida para um novo fermentador para a maturação, tomando-se os devidos cuidados de não coletar o resíduo (*trub*) do fundo do fermentador primário. O fermentador de maturação foi mantido a 12 °C por 7 dias e a 5 °C por mais 5 dias. Após a maturação foi coletada uma alíquota de 500 µL da cerveja para medir a densidade final (DF).

4.8.12 Priming, envase e carbonatação da cerveja

Para o *priming* da cerveja, 320 g de açúcar refinado foi dissolvido em 960 mL de água. A solução de açúcar foi aquecida até a fervura e, após o resfriamento, a solução foi adicionada ao fermentador de maturação e homogeneizada com a cerveja.

Na etapa de envase da cerveja, foram utilizadas garrafas (de 350 mL) de vidro âmbar, cuidadosamente lavadas, fervidas e sanitizadas com álcool etílico 70% e metabissulfito de potássio 10%. Com o auxílio de um envasador manual foram adicionados 300 mL de cerveja em cada garrafa, que em seguida foi tampada (com tampa tipo *Pry-off*) usando um engarrafador manual.

Para a carbonatação, as garrafas foram armazenadas em pé numa câmara térmica por 10 dias, a temperatura de 18 °C. Após esse período, as garrafas de cerveja foram mantidas a 5 °C até as análises posteriores.

4.9. Análises físico-químicas da cerveja

4.9.1. Cinética Fermentativa

Neste ensaio foram coletadas amostras de 1 mL (em triplicata) do mosto em fermentação a cada 24 h por 8 dias. As amostras foram transferidas para microtubos estéreis e centrifugados por 5 minutos a 8000 x g. Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para a medida da concentração de açúcar em °Brix. Os precipitados, correspondentes a biomassa de leveduras, foram mantidos por 48 h, a 100 °C em estufa de circulação. Em seguida, os tubos contendo as biomassas secas foram pesados em balança analítica e as concentrações das leveduras foram obtidas através da equação:

$$X(g/L) = \frac{m_{eb} - m_e}{V}$$

Onde:

X = Concentração da levedura seca (g/L)

m_{eb} = massa do tubo com a levedura seca (g)

m_e = massa do tubo (g)

v = volume da amostra utilizada (L)

4.9.2. Determinação do Amargor

O método para mensurar o amargor de cervejas utiliza a medida espectrofotométrica das substâncias responsáveis pelo amargor do lúpulo, os ácidos alfa e beta, seguindo metodologia da ASBC Methods of Analysis 23A. O resultado é expresso em Unidades de Amargor (I.B.U.). As unidades de amargor foram determinadas por meio da extração de substâncias amargas da cerveja com iso-octano (2,2,4-trimetilpentano). Um volume de 20 mL de cada amostra foi previamente acidificada pela adição de 0,5 mL de HCl 6,0 mol.L⁻¹ misturadas com 20 mL de iso-octano. Em seguida, foi realizada a medição espectrofotométrica no comprimento de onda de 275 nm em cubeta de quartzo, conforme metodologia descrita por Philpott, Taylor e Williams (1997) onde o resultado do amargor é calculado pela seguinte equação:

$$\text{Amargor (I.B.U.)} = \text{Abs (275 nm)} * 50$$

4.9.3. Determinação da intensidade da cor

As amostras foram filtradas em membrana 0,25 µm e em seguida foi realizada a leitura da absorbância a 430 nm, com o uso de uma cubeta de vidro, conforme metodologia descrita no EBC 9.6. O resultado da cor foi expresso usando a seguinte equação:

$$\text{Cor (EBC)} = \text{Abs (430nm)} * 25$$

4.9.4. Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados em pHmetro digital (Hanna, pH 21), conforme metodologia descrita pelo método 017/IV baseado em Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (MFAA), disponível em Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

4.10. Análise da atividade antioxidante do extrato microalgal e da cerveja ativada com o extrato de microalgas.

A atividade antioxidante foi medida pela capacidade de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), determinada segundo Kato *et al.* (2016), com

algumas modificações, com base no método original descrito por Blois (1958). Esse ensaio foi realizado em placas de microtitulação (de 96 poços), nas quais os poços denominados “amostra” foram adicionados 10 µL dos extratos (nas concentrações de 100 a 1.000 µg.mL⁻¹) e 190 µL da solução metanólica de DPPH (Sigma) a 78 µM. Nos poços denominados branco da amostra foram adicionados 10 µL dos extratos (nas concentrações supracitadas) e 190 µL de metanol. Nos poços denominados controle da amostra (controle negativo) foram adicionados 10 µL de metanol e 190 µL da solução metanólica de DPPH a 78 µM. O L-ácido ascórbico (Sigma) foi utilizado como controle positivo, nas mesmas concentrações dos extratos e tratado de forma idêntica. As placas contendo amostra, branco da amostra, controle da amostra e controle positivo foram agitadas e incubadas à temperatura ambiente por 30 min no escuro. Posteriormente, as absorvâncias foram lidas em 517 nm em leitora de microplaca (Biochrom Asys UVM 340). As análises foram realizadas em triplicata para cada concentração. A capacidade de sequestro do radical DPPH dos extratos e do controle positivo, expressos em porcentagem, foram calculados pela fórmula:

Capacidade de sequestro do radical DPPH (%)

$$= \frac{[\text{Abs controle} - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})]}{\text{Abs controle}} \times 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento da microalga *C. vulgaris* cultivada em fotobiorreator fechado

Ao final do 14º dia e após a aplicação da metodologia descrita no tópico de obtenção da biomassa microalgal de *C. vulgaris*, foi observado um rendimento médio de biomassa seca (Figura 7) de $1,52 \pm 0,93$ g/L.

Figura 7 - Biomassa microalgal liofilizada de *C. vulgaris*.



Fonte: Autor (2021)

O rendimento de biomassa seca obtido está dentro da faixa de valores relatados em trabalhos anteriores desenvolvidos no LabBMol sendo superior aos relatados pela literatura para cultivos em condições autotróficas (RATOMSKI; HAWROT-PAW, 2021; ANCCA et al., 2020).

Contudo, mesmo o rendimento obtido tendo sido maior que os já relatados em literatura para as condições de cultivo autotróficas, os valores de rendimento de biomassa obtidos para cultivos mixotróficos ainda são maiores (KONG et al., 2020; CAPORGNO et al., 2019; QUINTERO-DALLOS et al., 2019; BABAEI et al., 2018;

MIAO *et al.*, 2016; YEH; CHANG, 2012). Consequência da alta concentração de compostos orgânicos, fontes de N e P, presentes no meio (LI *et al.*, 2011).

No entanto, os cultivos mixotróficos levam à um aumento do conteúdo de lipídeos e à uma diminuição do conteúdo de clorofila dessa espécie (KONG *et al.*, 2020; CAPORGNO *et al.*, 2019; MIAO *et al.*, 2016), e para a cerveja, produto deste trabalho, a utilização de uma microalga com alto teor lipídico para produzir o extrato que foi adicionada à receita, pode trazer modificações à suas propriedades organolépticas. O aumento na concentração de ácidos graxos insaturados durante o processo de fervura do mosto pode aumentar a auto oxidação dos mesmos, formando hidroperóxidos e posteriormente o *trans*-2-nonenal, principal composto responsável por conferir *off-flavour* de “papela” à cerveja (SANTOS, 2002). A presença de *trans*-2-nonenal é um dos parâmetros analisados durante o armazenamento da cerveja. Sua presença é característica da perda de estabilidade de sabor e consequente envelhecimento da bebida, portanto uma grande quantidade de lipídeos na receita diminuiria sua vida de prateleira.

Quanto ao meio de cultivo, a escolha do meio NPK para obtenção da biomassa microalgal levou em consideração a simplicidade de sua formulação, a economia no custo dos nutrientes e a sua capacidade em aumentar a produção de biomassa da cultura. O meio NPK é projetado para fornecer os três nutrientes primários necessários para o crescimento da biomassa. Sua utilização elimina a necessidade de adição de N, P e K separadamente à cultura.

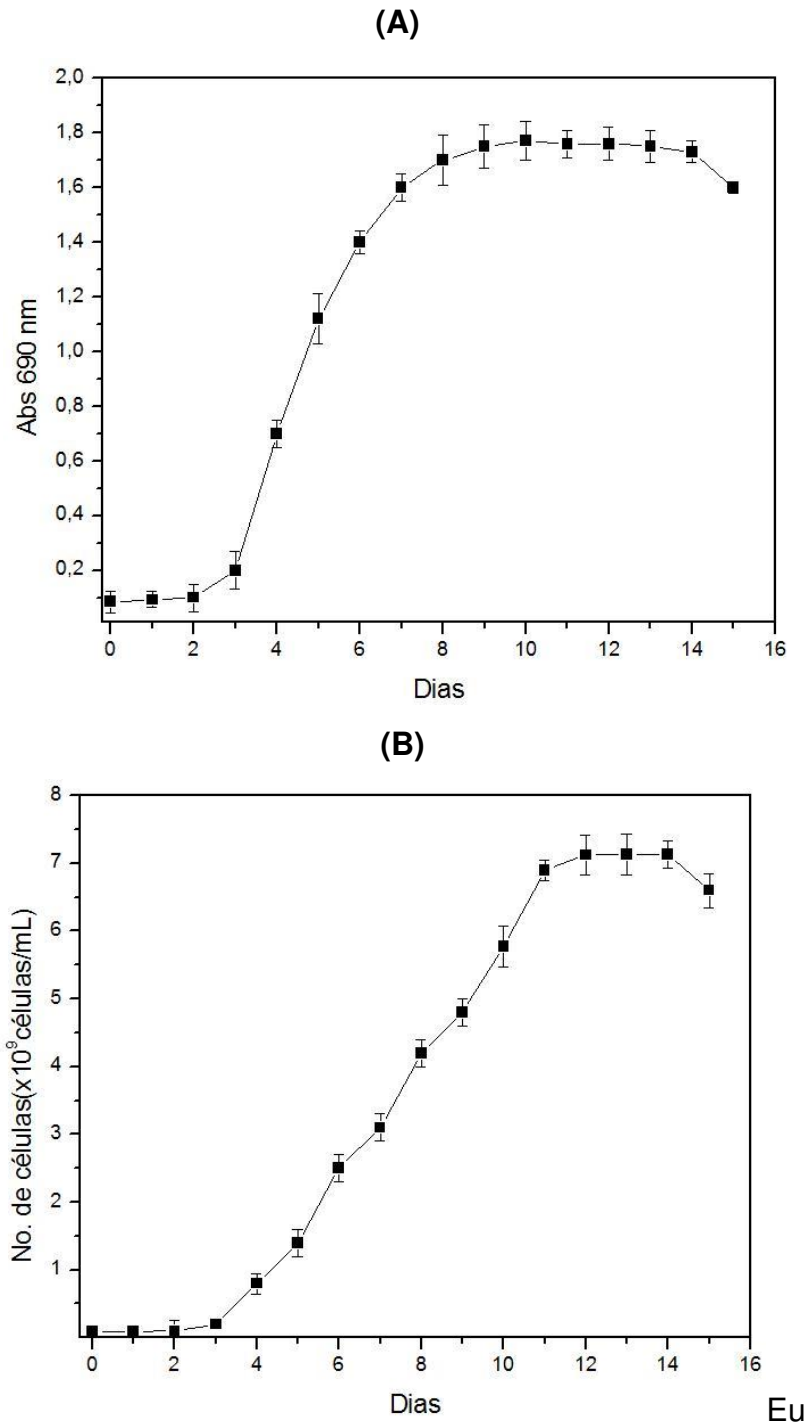
Manoz-Panuela *et al.* (2012), já haviam demonstrado que o meio NPK proporcionava um crescimento adequado e alto teor de proteínas à microalga *C. vulgaris*, quando comparado a outros meios de cultura. Kumari, Pathak e Guria (2015) conseguiram um aumento do crescimento de *Spirulina* em meio NPK e uma economia de 50% no custo de nutrientes quando comparado ao meio de cultura padrão (BG11).

Por ser um produto industrial, com capacidade de ser produzido em grande escala, a diminuição de custos é crucial para que a produção da cerveja aditivada com extrato microalgal se torne comercialmente favorável.

5.2 Curva de crescimento da microalga *C. vulgaris*

Os gráficos 5A e 5B mostram os resultados das curvas de crescimento da *C. vulgaris* em sistema de fotobiorreator fechado. O gráfico 5B foi construído a partir dos dados obtidos com a contagem diária de células, já o gráfico 5A foi produzido a partir leitura da absorbância (a 690 nm) do meio de cultivo, também coletado diariamente. Em ambos os gráficos pode-se observar que o cultivo apresentou uma curva padrão com as fases de crescimento (lag, exponencial, estacionária e declínio) bem definidas até o 15º dia.

Gráfico 5 – Curvas de crescimento das células de *Chlorella vulgaris* cultivadas em meio NPK utilizando fotobiorreator fechado. (A) gráfico construído a partir dos dados obtidos com a contagem diária de células; (B) gráfico produzido a partir leitura da absorbância (a 690 nm) do meio de cultivo.



Fonte: Dados da pesquisa.

A fase lag se manteve até o 2º dia, indicando uma rápida adaptação do pré-inóculo microalgal ao meio NPK. É importante destacar que esse meio vem sendo comumente utilizado para o cultivo de algumas espécies de microalgas, pois apesar de simples, fornece nutrientes necessários ao desenvolvimento, contribuindo para uma boa produtividade e composição celular adequada para obtenção de subprodutos de interesse industrial. Seu baixo custo é considerado um fator atrativo para o emprego em cultivos de larga escala de algumas espécies de microalgas.

A fase exponencial foi observada do 3º ao 11º dia de cultivo. Geralmente essa fase é caracterizada pelo aumento da síntese de macromoléculas (principalmente proteínas e enzimas) importantes para manutenção do metabolismo celular. Observa-se que, nessa fase o número de células variou entre 0,3 e 6,0 x 10⁹ células/mL, comportamento este que pode ser explicado pelo uso de condições experimentais adequadas ao crescimento das microalgas.

Já a fase estacionária compreendeu período entre o 12º e o 14º dia. Nessa fase, geralmente ocorrem mudanças na composição do meio provocadas pela produção de metabólitos ou pela exaustão de nutrientes essenciais, o que faz as células reduzirem a taxa de crescimento progressivo e entrarem em uma fase de estagnação que, sob novas condições, passam a ter crescimento lento e após alguns dias declinam. Neste caso, a fase de declínio começou a ser observada após o 14º dia.

O perfil da curva de crescimento obtido neste trabalho foi semelhante aos obtidos por Frumeto *et al* (2013), com a exponencial até o dia 8, a fase estacionária até o dia 14 e a fase de declínio a partir do dia 15, e por Yatirajula e colaboradores (2019), com uma fase exponencial de crescimento até o 8º dia, seguido de uma fase estacionária entre os dias 9 e 15, e a fase de declínio a partir do 16º dia.

5. 3 Caracterização da biomassa microalgal

Para a caracterização da biomassa microalgal de *C. vulgaris* obtida pelo cultivo autotrófico em biorreator, foi realizada a análise da composição centesimal (Tabela 9). Como resultado, a análise apresentou as proteínas (54,8 ± 1,5 %) como conteúdo majoritário da biomassa, o que já era esperado para a espécie e forma de

cultivo (BERTOLDI *et al.*, 2008; SEYFABADI; RAMEZANPOUR; KHOEYI, 2010; SAFI *et al.*, 2012; CHIA *et al.*, 2013; TOHAMY *et al.*, 2018), seguidas pelos lipídeos ($15,3 \pm 1,0$ %), carboidratos ($10,9 \pm 1,8$ %), cinzas ($7,5 \pm 0,5$ %), fibras ($7,4 \pm 0,3$ %) e umidade ($4,1 \pm 0,2$ %).

Tabela 9 - Análise centesimal da biomassa microalgal de *C. vulgaris* com base em 100 g da massa seca.

Constituinte	Teor na biomassa (%)
Umidade	$4,1 \pm 0,2$
Cinza	$7,5 \pm 0,5$
Fibra bruta	$7,4 \pm 0,3$
Lipídeos	$15,3 \pm 1,0$
Proteína total*	$54,8 \pm 1,5$
Carboidratos**	$10,9 \pm 1,8$

* Nitrogênio total x 6,25

**Obtido por diferença

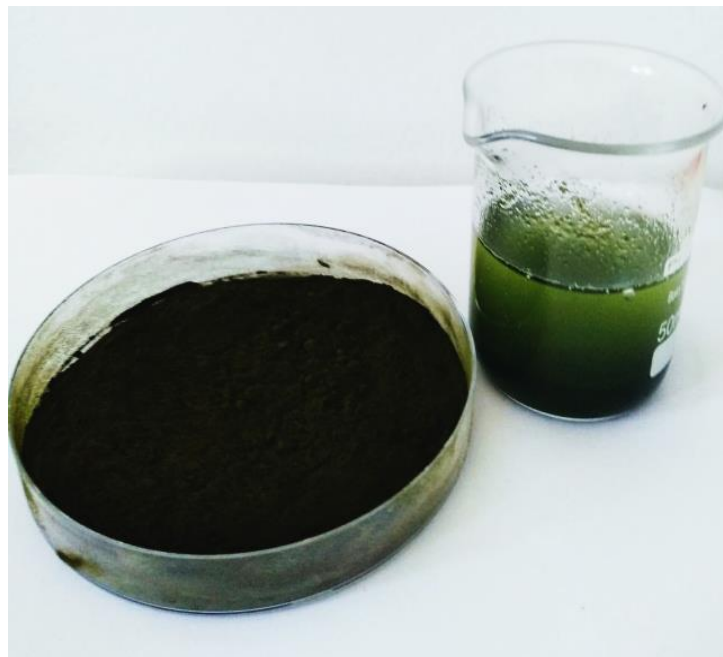
Fonte: Dados da pesquisa.

Niccolai *et al.* (2019) encontrou valores de 56,8% de proteínas, 16,9% de lipídeos, 9,3% de cinzas, 5,9% de carboidratos e 4,9% de umidade para a *C. vulgaris* comercializada pela empresa ALMA MICROALGAE (Portugal). Molino *et al.* (2018), em seus estudos obteve 45,64% de proteínas, 35,04% de fibras, 10,88% de cinzas, 5,30% de carboidratos, 3,13% de lipídeos e 1,92% de umidade para a *C. vulgaris* comercializada pela MICOPERI BLUE GROWTH® (Ravenna, Italy).

5.4 Preparo do extrato de microalgas e dosagem de proteínas solúveis

O extrato microalgal (Figura 8) foi preparado usando solvente aquoso e uma combinação de duas técnicas básicas: congelamento e descongelamento + ultrassom. O uso de um solvente como a água, barateia o processo, minimiza os riscos, já que é não inflamável e não tóxico, e não influencia na formulação final da receita em que o extrato será empregado, além de apresentar maior atividade antioxidante que extratos etanólicos (MATOS *et al.*, 2019).

Figura 8 - Extrato de células lisadas *Chlorella vulgaris*



Fonte: Autor (2021)

A lise por ultrassom é uma das técnicas que apresenta elevada eficiência na extração de compostos bioativos das microalgas (ZAHAIR et al., 2017) e alguns estudos mostram que a combinação de duas técnicas ou mais aumentam a eficiência de extração proteica (COELHO et al., 2019; PHONG et al., 2018).

Phong et al. (2018) em seus estudos, comparou três métodos de lise: alcalino; ultrassom; alcalino + ultrassom. O tratamento alcalino seguido por ultrassom teve uma vantagem combinada de rompimento celular fornecido pela cavitação ultrassônica, bem como o poder de solubilidade do solvente. Dado a mesma duração da exposição, verificou-se que o rendimento proteico das *C. vulgaris* tratadas com o método combinado foi ligeiramente mais alto do que o do tratamento único, tanto alcalino quanto ultrassom.

A simplicidade das técnicas empregadas também foi levada em consideração, já que os métodos de ruptura das células é um gargalo na utilização de extratos microalgais em processos industriais de larga escala, devido ao alto custo e baixo escalonamento (PHONG et al., 2018).

Após a produção do extrato, a avaliação da concentração de proteínas solúveis totais do extrato aquoso foi realizada pelo método de Bradford (1976),

observando-se um teor de $1,7 \pm 0,3$ μg de proteína por mg de microalga utilizada e uma concentração total de $68 \pm 0,3$ mg de proteína nos 60 ml de extrato (Tabela 10).

Tabela 10 - Determinação da concentração de proteínas solúveis totais do extrato bruto aquoso obtido a partir da biomassa microalgal de *Chlorella vulgaris*

Fração	Massa seca microalgal (g)	Concentração de proteína ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Proteína solúvel total (mg)
EB*	40	$1,7 \pm 0,3$	$68 \pm 0,3$

*Extrato bruto de *C. vulgaris*

Fonte: Dados da pesquisa.

A dosagem de proteínas foi realizada não com o intuito de analisar a diversidade proteica encontrada no extrato, mas sim a fim de avaliar a eficiência dos métodos de lise empregados. Quanto maior a exposição do conteúdo proteico, maior a eficiência dos métodos de lise.

Buchmann *et al.* (2019), em seus estudos encontrou concentrações entre $0,55 \pm 0,01$ g/L e $0,8 \pm 0,04$ g/L em extratos aquosos de *C. vulgaris* cultivadas em meio BG11 (NaNO_3 ; K_2HPO_4 ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 + \text{H}_2\text{O}$; citrato férrico amoniacal; $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Na_2CO_3 ; Tiosulfato de sódio penta hidratado; solução de metais traços) e Lai *et al.* (2019), obteve concentrações variando entre 0,69 g/L e 0,79 g/L, e atribuiu os altos valores obtidos ao aumento do suprimento de N, C e CO_2 no meio BG11. Já os resultados relatados por Callejo-Lopez *et al.* (2019) indicam concentrações proteicas entre 0,79 g/ml e 1,39 g/ml em extratos aquosos produzidos pela combinação dos métodos de lise alcalina e enzimática.

Bradford (1976) é um método preciso para a quantificação de proteínas e não requer fatores de conversão. No entanto, este método determina apenas as proteínas hidrossolúveis (DINIZ *et al.* 2011) e não o conteúdo total de proteínas.

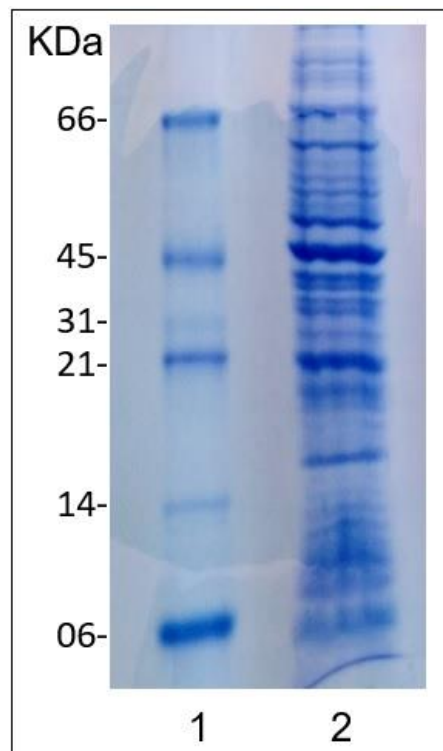
Mesmo com o alto conteúdo proteico da biomassa microalgal, a concentração de proteínas solúveis, quando relacionada às proteínas totais, será sempre baixa, pois a determinação do teor bruto de proteínas é realizada pelo método de kjeldahl, que mede o N orgânico total da amostra, não apenas N provenientes de proteínas, o que pode superestimar o conteúdo proteico.

5.5 Análise eletroforética do extrato microalgal

Para avaliar qualitativamente as populações de proteínas presentes no EB de *C. vulgaris* e determinar suas massas moleculares aparentes em condições desnaturantes, foi realizada eletroforese SDS-PAGE.

O perfil eletroforético do extrato aquoso da *C. vulgaris* (Figura 9) delineou-se por uma ampla faixa de massa molecular, variando entre 116 KDa e 6 KDa, com uma maior quantidade de bandas entre 66 KDa e 21 KDa, sugerindo a presença de uma ampla diversidade de proteínas. Pode-se também observar que há uma coloração mais intensa, o que sugere uma maior concentração proteica, na faixa de 45 KDa e 21 KDa.

Figura 9 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE-SDS 15%) do extrato aquoso obtido a partir da biomassa microalgal de *Chlorella vulgaris*.



Linha 1 - Marcador molecular de proteínas: Aprotinina (6 kDa); Lisozima (14 kDa); Inibidor de tripsina (21 kDa); Anidrase carbônica (31 kDa); Ovalbumina (45 kDa); Albumina sérica bovina (66 kDa);
Linha 2 – Extrato de microalgas.

Fonte: Autor (2021)

O perfil eletroforético do extrato aquoso de *C. vulgaris* obtido pelo método de lise enzimática apresentado por Zahair *et al.* (2017) mostra um número menor de bandas compreendidas em uma faixa de massa molecular aparente entre 66 e 6 kDa, o que demonstra baixa diversidade das proteínas extraídas.

Comparando o perfil eletroforético do extrato aquoso de *C. vulgaris* obtido neste trabalho com o perfil eletroforético do extrato aquoso de *C. vulgaris* obtido por Zahair e seus colaboradores (2017), podemos observar que o método de lise combinado (congelamento e descongelamento + ultrassom) produz extratos com maior diversidade de proteínas, o que demonstra a eficiência do método de lise utilizado no trabalho em diminuir a barreira atribuída pela parede celular, muito embora a concentração de proteínas solúveis não tenha sido tão elevada.

Concentrações de proteínas no intervalo de peso molecular entre 14,3 e 66,0 kDa foram encontrados por Venkataraman Prakash e Nirmala (1992), em ensaios realizados com a cianobactéria *Spirulina*, e por Jacob-Lopes *et al.* (2006), em pesquisa com a cianobactéria *Aphanothece microscopica Nægeli*. Rouxel *et al.* (2001), estudou a fração proteica das algas *Chondrus crispus*, *Palmaria palmata* e *Porphyra umbicalis*, utilizadas na alimentação humana, e também observou em seus resultados a predominância de proteínas que se enquadravam na mesma faixa.

5.6 Análise da atividade antioxidante do extrato microalgal e da cerveja aditivada com o extrato de microalgas

A atividade antioxidante do extrato aquoso de *C. vulgaris* se baseou no ensaio do DPPH. O método é o mais empregado para avaliar a capacidade de sequestro de radicais livres nas microalgas (SHIMOJI *et al.*, 2002; BENVENUTI *et al.*, 2004; SAKANAKA; TACHIBANA, 2006), e permite a avaliação de amostras em solução aquosa ou etanólica, o que permitiu o uso do mesmo método para a análise do extrato microalgal e das cervejas.

Este ensaio se baseia no mecanismo de transferência de um elétron, processo que permite detectar a capacidade de um potencial antioxidante em transferir um elétron e reduzir qualquer substância, incluindo metais, carbonilas e radicais (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). A substância antioxidante age como doador de um átomo de hidrogênio quando é adicionada à solução de DPPH, reduzindo o

radical DPPH e formando a hidrazina, propiciando assim a mudança de coloração na solução, de violeta para amarelo claro (CASTELO-BRANCO; TORRES, 2011).

Os resultados da atividade antioxidante estão relatados na tabela 11 e mostram que houve um aumento da capacidade de sequestro de radicais livres na cerveja aditivada com o extrato aquoso de *C. vulgaris* ($25,3 \pm 2,01$; $13,0 \pm 0,90$; $3,03 \pm 0,90$; $1,51 \pm 0,42$) em comparação à cerveja controle ($12,1 \pm 2,3$; $2,73 \pm 1,31$; $0,76 \pm 0,15$; $0,22 \pm 0,10$) para todas as concentrações testadas. Também pode-se observar que a capacidade de sequestro de radicais livres da cerveja aditivada na concentração de 1:1 (v/v), foi semelhante à capacidade de sequestro de radicais livres do extrato bruto microalgal (EB) na concentração de 1:1 (v/v) e do ácido ascórbico (controle positivo) na concentração de 100 µg/ml.

Tabela 11 - Capacidade de sequestro do DPPH do extrato bruto da biomassa microalgal e da cerveja artesanal aditivada com o extrato bruto das microalgas *C. vulgaris*

Concentração controle positivo (µg/mL)	% DPPH Ác. Ascórbico	Concentração das amostras (v/v)	% DPPH EB	% DPPH CC	% DPPH CC + EB
100	$42,5^a \pm 1,36$	1:1	$25,8^d \pm 2,27$	$12,1^e \pm 2,3$	$25,3^d \pm 2,01$
200	$80,47^b \pm 0,23$	1:5	$12,6^e \pm 0,90$	$2,73^f \pm 1,31$	$13,0^e \pm 0,90$
300	$95,68^c \pm 0,18$	1:10	$2,87^f \pm 0,85$	$0,76^f \pm 0,15$	$3,03^f \pm 0,90$
400	$96,78^c \pm 0,56$	1:15	$1,33^f \pm 0,68$	$0,22^f \pm 0,10$	$1,51^f \pm 0,42$
500	$97,02^c \pm 0,23$				
600	$97,82^c \pm 0,34$				
700	$98,04^c \pm 0,44$				
800	$98,17^c \pm 0,63$				
900	$97,61^c \pm 0,26$				
1000	$98,20^c \pm 0,55$				

EB Extrato bruto da biomassa microalgal

CC Cerveja controle

Fonte: Dados da pesquisa.

O aumento da capacidade de sequestro de radicais livres da cerveja aditivada está relacionada à alta capacidade antioxidante da microalga *Chlorella vulgaris*, que é uma fonte rica em ácido ascórbico, α -tocoferol, vitaminas (VIJAYAVEL *et al.*, 2007; SANTHOSH *et al.*, 2020) e pigmentos, principalmente carotenóides (α - e β -caroteno), luteína, feofitina e clorofilas (clorofila a e b) (CHA *et al.*, 2010;

RODRIGUEZ-GARCIA; GUIL-GUERRERO, 2007; HAJIMAHMOODI *et al.*, 2010; PLAZA *et al.*, 2012; JAYSHREE *et al.*, 2016; ALAVI; GOLMAKANI, 2017).

Na indústria alimentícia, alimentos ricos em compostos antioxidantes, assim como a *C. vulgaris*, estão sendo cada vez mais usados, tanto para inibir, prevenir ou retardar a deterioração pela oxidação (redução de radicais livres), como para conferir características funcionais aos alimentos.

No caso da cerveja, os compostos antioxidantes vão diminuir a quantidade de metabolitos gerados pela oxidação de álcoois, autooxidação de ácidos graxos insaturados e degradação oxidativa de isohumulonas, reações que ocorrem durante o armazenamento (GUIDO, 2016). Esse retardo no processo oxidativo pode aumentar a estabilidade do perfil de sabor das cervejas durante o armazenamento e conseqüentemente aumenta seu tempo de prateleira (ABRAHAMSSON *et al.*, 2012; ZHENG *et al.*, 2017). O aumento de vida de prateleira de cervejas devido ao aumento da atividade antioxidante das mesmas pode ser observado no trabalho desenvolvido por De Francesco e colaboradores (2020), que formularam cervejas com a adição de extratos ricos em compostos fenólicos.

O uso de *C. vulgaris* na formulação de alimentos visando o aumento da atividade antioxidante e conseqüentemente proteção oxidativa dos mesmos, pode ser observado em outros trabalhos. Atitallah *et al.* (2019) relatou uma capacidade de 98% no sequestro de radicais DPPH em hamburguers de peixe produzidos com 0,5% de *C. vulgaris*, enquanto os hamburguers sem a adição de microalga só apresentaram atividade de 40%. Alavi e Golmakani (2017) demonstraram em seu trabalho o efeito protetor da adição de *Chlorella* na oxidação de azeite de oliva virgem e o aumento da estabilidade do produto.

O uso da *C. vulgaris* também já foi relatado para a produção de queijo. Tohamy *et al.* (2018) obteve um acréscimo de 24,5 % na atividade antioxidante do queijo aditivado com 4% de microalga, o que aumentou seu tempo de prateleira.

Quando comparamos os resultados de atividade antioxidante obtidos neste trabalho com os resultados obtidos por Atitallah *et al.*, (2019), Tohamy *et al.*, (2018) e Alavi e Golmaki (2017), não identificamos um aumento tão expressivo na capacidade de sequestro de radicais, o que pode ser atribuído à perda de alguns metabolitos, principalmente ácido ascórbico, durante o processo de fervura do mosto, momento em que o extrato aquoso de *C. vulgaris* é adicionado ao processo.

A diminuição da concentração de compostos bioativos oriundos de *C. vulgaris* após um processo de aquecimento pode ser observado no trabalho de Igual *et al.*, (2021). O grupo analisou as concentrações de ácido ascórbico, carotenoides e clorofila a em um pão adicionado de *C. vulgaris* após sua cocção e identificaram uma diminuição das concentrações de carotenoides e clorofila a e o total desaparecimento de ácido ascórbico.

Diante do aumento da atividade antioxidante da cerveja aditivada com o extrato de *C. vulgaris* e da importância que o aumento da capacidade de sequestro de radicais livres exerce na vida de prateleira das cervejas, após 2 anos de armazenamento da cerveja aditivada a 5 °C, a análise de atividade antioxidante pelo método DPPH foi realizada novamente. A nova análise objetivou avaliar a capacidade de sequestro de radicais livres após o longo período de armazenamento das cervejas aditivadas. Os valores obtidos estão relatados a seguir (Tabela 12).

Tabela 12 - Capacidade de sequestro do DPPH da cerveja artesanal aditivada com o extrato bruto das microalgas *C. vulgaris* após 2 anos de armazenamento.

Concentração controle positivo (µg/mL)	% DPPH Ác. Ascórbico	Concentração das amostras (v/v)	% DPPH Cerveja *
100	42,731 ^a ± 3,118	1:1	55,23 ^d ± 1,62
200	80,901 ^b ± 1,701	1:5	28,92 ^e ± 1,10
300	96,218 ^c ± 0,135	1:10	22,98 ^e ^f ± 1,98
400	96,996 ^c ± 0,526	1:15	17,34 ^f ± 1,06
500	96,888 ^c ± 0,420		
600	97,532 ^c ± 0,526		
700	97,532 ^c ± 0,722		
800	98,015 ^c ± 0,771		
900	97,452 ^c ± 0,161		
1000	98,203 ^c ± 0,550		

*aditivada com o extrato bruto de *C. vulgaris*.

Fonte: Dados da pesquisa.

A capacidade de sequestro de radicais DPPH da cerveja aditivada com o extrato aquoso de *C. vulgaris* após o armazenamento de 2 anos (55,23 %) foi superior à porcentagem de sequestro de radicais DPPH apresentada na primeira análise (25,3 %) pela cerveja aditivada (sem período de armazenamento) e superior à atividade antioxidante do ácido ascórbico na concentração de 100 µg/ml. O aumento da atividade antioxidante não é usual, visto que durante o período de armazenamento de

cerveja o esperado é que haja uma diminuição gradual do poder de sequestro de radicais livres (LI *et al.*, 2016).

Nesse caso, o aumento significativo da atividade antioxidante após o longo período de armazenamento da cerveja pode estar relacionado com a presença de resíduos celulares de *C. vulgaris* na cerveja engarrafada. Ao fim da fermentação, o etanol produzido pelas leveduras em contato com o lisado residual pode ter promovido a extração de outras moléculas com atividade antioxidante, que não haviam sido extraídas durante a extração aquosa.

Outro fator que pode explicar o aumento da atividade antioxidante após o longo período de armazenamento é a biotransformação realizada pelas leveduras. Durante a biotransformação, as leveduras metabolizam alguns compostos antioxidantes em formas mais livres, que possuem maior capacidade de sequestro de radicais livres (LEONARD *et al.*, 2021).

Além da influência positiva no retardo dos processos oxidativos, o aumento da atividade antioxidante da cerveja formulada com o extrato microalgal torna a bebida em um alimento funcional. Essa designação pode ser concedida à cerveja aditivada produzida devido aos benefícios à saúde associados ao consumo de alimentos ricos em compostos antioxidantes (LAJOLO, 2001). O conteúdo antioxidante dos alimentos é considerado um importante fator de proteção à saúde, pois fornece aos consumidores proteção contra doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, arteriosclerose, doenças neurodegenerativas, diabetes, doenças cardíacas e envelhecimento precoce (KASSAN; MONTERO; SEVILLA, 2010; TSVETKOVA *et al.*, 2013).

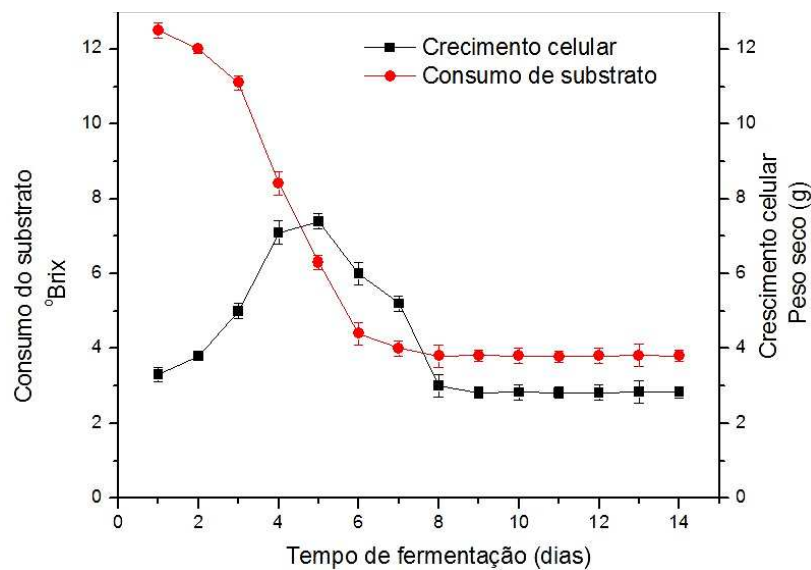
Esse conteúdo de compostos antioxidantes é ainda mais importante em bebidas alcoólicas, como é o caso da cerveja. A oxidação do etanol e seus metabólitos pelo organismo aumentam a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, levando ao início da peroxidação (HENDERSON *et al.*, 1999; LIEBER, 2004), que em altas concentrações podem causar injúrias no organismo e acarretar diversas doenças. Assim, a propriedade antioxidante da cerveja pode diminuir a peroxidação causada pela ingestão de etanol, gerando um aumento dos antioxidantes em detrimento das moléculas pró-oxidantes (ADDOLORATO *et al.*, 2009; LIEBER, 2005).

5.7 Cinética do processo fermentativo

O estudo cinético do processo fermentativo da cerveja artesanal aditivada com o extrato bruto de *C. vulgaris* baseou-se nas análises evolutivas do crescimento celular da levedura *S. cerevisiae* (SafALE™ US-05) e a sua capacidade de consumir o substrato (mosto) em função do tempo.

O perfil cinético do processo fermentativo está apresentado no gráfico 6, onde é possível verificar a evolução do crescimento celular e o consumo de substrato durante a fermentação primária. Os mostos fermentados pela levedura apresentaram número máximo de células em suspensão com 5 dias de fermentação seguidos de um decaimento na densidade celular, que se explica pela diminuição da densidade do mosto e aumento da concentração de etanol.

Gráfico 6 - Cinética do processo fermentativo da cerveja ativada com o extrato bruto da microalga *Chlorella vulgaris*



Fonte: Dados da pesquisa.

No gráfico pode-se notar que nos primeiros dias houve um aumento exponencial da população celular devido ao excesso de substrato. À medida que o número de células aumenta, os ácidos graxos insaturados e os esteróis são distribuídos entre a população celular, havendo assim, uma redução na taxa de crescimento. Nesta transição, as células iniciam o processo de assimilação da maltose e mudam gradualmente para a fase estacionária à medida que a concentração de

açúcar diminui. É comum ocorrer uma sedimentação celular enquanto os açúcares restantes são assimilados em taxas mais lentas (PRIEST; STEWART, 2006).

A concentração de sólidos solúveis do mosto tem influência direta na densidade celular, que também é influenciada pelas concentrações de etanol e CO₂. O aumento da concentração de etanol é resultado da ação do processo fermentativo das leveduras, o que gera a diminuição da densidade do mosto.

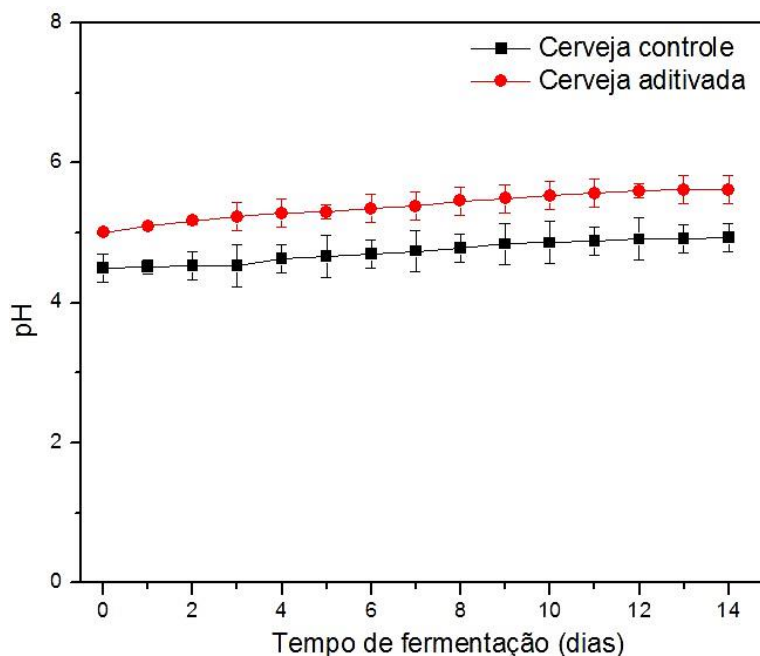
5. 8 Avaliação do pH durante o processo fermentativo

Um dos fatores químicos que afeta a eficiência da conversão de açúcar em etanol é o pH, grandeza responsável por medir a concentração de íons hidrogênio disponíveis no meio (LIMA *et al.* 2001).

O pH exerce importante ponto de controle em todo o processo, uma vez que influencia as reações enzimáticas, controla a contaminação bacteriana, controla o crescimento da levedura e controla a formação de subprodutos (SOUZA, 2009). Valores de pH muito altos aumentam a taxa de floculação das células de levedura e influenciar no volume alcoólico da cerveja e na sua atenuação.

No gráfico a seguir (Gráfico 7), podemos observar que a fermentação partiu de um pH inicial de 4,5 na cerveja controle e 5,0 na cerveja aditivada com extrato de *C. vulgaris* e terminou em um pH de 4,9 e 5,6, respectivamente.

Gráfico 7 – Variação de pH durante a fermentação primária da cerveja aditivada com o extrato aquoso de *Chlorella vulgaris*.



Fonte: Dados da pesquisa.

Comparando o perfil de pH do processo fermentativo das duas cervejas, podemos perceber um aumento do pH inicial na cerveja aditivada em comparação com a cerveja controle, o que sugere a presença de moléculas, principalmente proteínas e aminoácidos, de caráter menos ácido no mosto ao fim da fervura. Essa característica é conservada durante a fermentação, visto que o pH da cerveja aditivada permanece maior que o pH da cerveja controle durante toda a fermentação.

Outra característica apresentada pelo processo fermentativo das duas cervejas é o aumento do pH do mosto durante o processo, contrariando a “lógica” dos eventos bioquímicos envolvidos na fermentação, que deveriam ocasionar uma diminuição do pH do meio devido ao transporte de prótons do interior das células para o meio, a produção de ácido carbônico, derivado do dióxido de carbono, e a produção de ácidos orgânicos (lático, cítrico, pirúvico, málico, acético, fórmico, succínico e butírico) (BRIGGS *et al.*, 2004).

Diante do observado, levantou-se a hipótese de que o aumento de pH do processo fosse uma característica do processo fermentativo alcoólico conduzido pela cepa de *S. cerevisiae* (US-05) utilizada neste trabalho. Contudo, essa hipótese foi

descartada ao realizar a análise do perfil de pH de outros processos fermentativos conduzidos com a mesma cepa (LIU; QUEK, 2016).

Diante do exposto até aqui e sabendo que os eventos bioquímicos que acontecem durante a fermentação refletem não apenas o genótipo, mas também fenótipo das leveduras utilizadas no processo (BRIGGS *et al.*, 2004), acredita-se que a crescente nos valores de pH durante o processo fermentativo pode estar relacionado à composição do mosto, visto que alguns trabalhos relatam um aumento do pH do meio devido a presença de agentes estressantes (ADEBOYE *et al.*, 2015; HENRIQUE; VENTURINI FILHO, 2014). Entretanto, se faz necessário uma análise mais profunda do conteúdo do mosto para que qualquer afirmação seja realizada.

Por fim, após comparação dos resultados do perfil de pH com o perfil cinético dos processos fermentativos (Figura 5) conduzidos por este trabalho, pode-se afirmar que o aumento de pH atribuído à adição do extrato microalgal no mosto e o aumento gradual do pH do mosto durante a fermentação não afetou negativamente o processo fermentativo. Esta era uma preocupação, uma vez que os meios menos ácidos poderiam ter aumentado a taxa de floculação, comprometendo o desenvolvimento das leveduras e a conversão de açúcares em etanol e CO₂ (LUDWIG *et al.*, 2001).

5.9 Análise físico-química da cerveja artesanal aditivada com extrato de *Chlorella vulgaris*

Os dados de cor, amargor, teor alcoólico e pH final das cervejas controle e aditivada estão apresentados na tabela a seguir (Tabela 13).

Tabela 13 – Caracterização físico-química da cerveja artesanal aditivada com extrato de *Chlorella vulgaris*

Amostra	pH	Cor (EBC)	Amargor (IBU)	ABV (%vol)
Cerveja controle*	4,9 ± 0,2	12,33±0,15	35,5±0,20	5,4±0,10
Cerveja aditivada	5,6 ± 0,3	16,25±0,22	35,5±0,28	5,4±0,12

*Não aditivada com o extrato de *C. vulgaris*

Fonte: Dados da pesquisa.

Dentre as características analisadas, podemos observar a igualdade dos índices de amargor (IBU) e do teor alcoólico (ABV) nas duas cervejas e uma alteração na coloração (EBC) e pH final da cerveja aditivada em comparação com a cerveja controle.

A igualdade do teor alcoólico em ambas as cervejas sugere que o extrato da microalga não exerceu inibição do processo fermentativo, o que poderia ter acontecido devido ao aumento de pH do mosto induzido pela adição do extrato ou pela presença de compostos fenólicos, que em altas concentrações podem exercer efeito inibitório em fermentações alcoólicas (WANG et al., 2017; ADEBOYE et al., 2015; GARCIA et al., 2010).

Quanto ao IBU, a igualdade de valores entre as duas cervejas corrobora a não influência do aumento de pH durante o processo, visto que o mesmo poderia afetar os componentes de amargor oriundo do lúpulo (BAMFORTH, 2016). Ademais, a não modificação do índice de amargor também demonstra a não contribuição do extrato microalgal com compostos de amargor para o produto final.

Com relação a coloração das duas cervejas, observa-se que a adição do extrato microalgal resultou em uma cerveja mais escura (16,25 EBC), com uma coloração esverdeada (Figura 10), quando comparada à coloração da cerveja controle (12,33 EBC). Contudo, mesmo com a mudança de coloração, a cerveja aditivada ainda estava na mesma faixa de cor estabelecida para o estilo de cerveja produzida sem a adição do extrato (EBC entre 10 e 18).

Figura 10 - Cerveja estilo APA produzida com a adição do extrato microalgal de *C. vulgaris*



Fonte: Autor (2021).

A alteração na cor da cerveja aditivada é resultado da presença dos pigmentos naturais da microalga, principalmente a clorofila, e pode ser observada mesmo após 2 anos de estocagem (Figura 11).

Figura 11 - Cerveja estilo APA produzida com a adição do extrato microalgal de *C. vulgaris* após 2 anos de armazenamento.



Todos os valores obtidos de cor (EBC), amargor (IBU) e teor alcoólico estão dentro dos valores estabelecidos como característicos para cervejas do tipo APA pela *Beer Judge Competition Program* (BJCP, 2015).

- IBUs: 30 – 50
- EBC: 10 - 18 (dourado claro à âmbar claro).
- ABV: 4.5% – 6.2%

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados, podemos concluir que é possível a produção de uma cerveja artesanal estilo Ale com a adição de extrato aquoso da microalga *Chlorella vulgaris*. As análises da cinética fermentativa e as análises físico-químicas realizadas demonstram que a adição do extrato aquoso de *C. vulgaris* não interfere no processo fermentativo e provocam pouca ou nenhuma alteração nas principais características físico-químicas exigidas para caracterizá-la dentro do estilo de cerveja produzida.

Além disso, o processo de produção resultou em uma bebida funcional, com um aumento significativo da atividade antioxidante da cerveja, mesmo após um período de 2 anos de armazenamento. Alimentos ricos em compostos antioxidantes são extremamente atrativos ao mercado de alimentação natural, uma vez que são um importante fator de proteção à saúde humana.

Como perspectivas deste trabalho, com o intuito de enriquecê-lo, alguns testes complementares àqueles já realizados se fazem necessários:

- Condução da análise sensorial;
- Caracterização dos compostos antioxidantes presentes nas cervejas, com o intuito de avaliar a contribuição do extrato microalgal na concentração e diversidade desses compostos;
- Caracterização dos compostos bioativos presentes na cerveja aditivada, com o intuito de investigar a presença de outras moléculas que contribuam à funcionalidade da cerveja;
- Avaliação da atividade antioxidante da cerveja em células (*in vitro*).

REFERENCIAS

- ABELLÁN, A.; DOMÍNGUEZ-PERLES, R.; GIMÉNEZ, M. J.; ZAPATA, P. J.; VALERO, D. GARCÍA-VIGUERA, C. The development of a broccoli supplemented beer allows obtaining a valuable dietary source of sulforaphane. **Food Bioscience**, v. 39, 2021 Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100814> Acesso em: 10 de jan. de 2021.
- ABRAHAMSSON, V., HOFF, S., NIELSEN, N.J., LUND, M.N. & ANDERSEN, M.L. Determination of sulfite in beer based on fluorescent derivatives and liquid chromatographic separation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 70, p. 296–302, 2012.
- ADEBOYE, P. T., BETTIGA, M., ALDAEUS, F., LARSSON, P. T., & OLSSON, L. Catabolism of coniferyl aldehyde, ferulic acid and p-coumaric acid by *Saccharomyces cerevisiae* yields less toxic products. **Microbial Cell Factories**, v. 14(1), 2015. doi:10.1186/s12934-015-0338-x
- AKAO, Y., EBIHARA, T., MASUDA, H., SAEKI, Y., AKAZAWA, T., HAZEKI, K., SEYA, T. Enhancement of antitumor natural killer cell activation by orally administered Spirulina extract in mice. **Cancer Science**, 100(8), 1494–1501. 2009
- ALAVI, N., & GOLMAKANI, M. T. Improving oxidative stability of virgin olive oil by addition of microalga *Chlorella vulgaris* biomass. **Journal of Food Science and Technology**, 54(8), 2464–2473. 2017
- ALMEIDA, H. N., CALIXTO, G. Q., CHAGAS, B. M. E., MELO, D. M. A., RESENDE, F. M., MELO, M. A. F., & BRAGA, R. M. (Characterization and pyrolysis of *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*: potential of bio-oil and chemical production by Py-GC/MS analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, 24(16), 14142–14150. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9009-2>
- ANCCA, S. M.; ALVAREZ, Y.; SOSA, L. E.; VIZCARRA, Y. G. Celular concentration and dry biomass in three species of marine microalgae: *Chlorella*
- AL-ZUHAIR, S., ASHRAF, S., HISAINDEE, S., DARMAKI, N. AL, BATTAH, S., SVISTUNENKO, D., ... CHAUDHARY, A. Enzymatic pre-treatment of microalgae cells for enhanced extraction of proteins. **Engineering in Life Sciences**, 17(2), 175–185. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/elsc.201600127>
- AMA Association for Sensor Technology. **Sensor Trends 2014: Trends in Future-Oriented Sensor Technologies**. AMA Fachverband, Germany. 2010.
- AMBEV, **Programa de Formação Técnica, Cervejeiros AmBev**. São Paulo: AmBev, 2012.

ASBC – **Methods of Analysis of the American Society of Brewing Chemists**. Eighth Revised Edition. Minnesota: The Technical Committee and Editorial Committee of the ASBC, 1996

AZLAN, N. Z.; GHAFAR, N. A.; YUSOF, Y. A. M.; MAKPOL, S. Toxicity study of *Chlorella vulgaris* water extract on female Sprague Dawley rats by using the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline 420. **Journal of Applied Phycology**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02195-0> Acesso em: 05 de jan. de 2021

AZOCAR, J., & DIAZ, A. Efficacy and safety of *Chlorella* supplementation in adults with chronic hepatitis C virus infection. **World Journal of Gastroenterology**, 19(7), 1085–1090. 2013

BABAEI, A., MEHRNIA, M. R., SHAYEGAN, J., SARRAFZADEH, M. H., & AMINI, E. Evaluation of Nutrient Removal and Biomass Production Through Mixotrophic, Heterotrophic, and Photoautotrophic Cultivation of *Chlorella* in Nitrate and Ammonium Wastewater. **International Journal of Environmental Research**, 12(2), 167–178. 2018

BAE, M. J., SHIN, H. S., CHAI, O. H., HAN, J. G., & SHON, D. H. Inhibitory effect of unicellular green algae (*Chlorella vulgaris*) water extract on allergic immune response. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 93(12), 3133–3136. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.6114>

BAMFORTH, C. W. **Barley and Malt Starch in Brewing: A General Review**. *MBAA TQ*, 40, no. 2, pp. 89-97. 2013.

BAMFORTH, C. W. **Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence**. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/C2013-0-13349-1>

BARBORÍKOVÁ, J., ŠUTOVSKÁ, M., KAZIMIEROVÁ, I., JOŠKOVÁ, M., FRAŇOVÁ, S., KOPECKÝ, J., & CAPEK, P. Extracellular polysaccharide produced by *Chlorella vulgaris* – Chemical characterization and anti-asthmatic profile. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.135, 1–1, 2019. doi:10.1016/j.ijbiomac.2019.05.104

BATISTA, A. P., NICCOLAI, A., FRADINHO, P., FRAGOSO, S., BURSIC, I., RODOLFI, L., RAYMUNDO, A. Microalgae biomass as an alternative ingredient in cookies: Sensory, physical and chemical properties, antioxidant activity and in vitro digestibility. **Algal Research**, 26(July), 161–171. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.07.017>

BEHESHTIPOUR, H., MORTAZAVIAN, A. M., MOHAMMADI, R., SOHRABVANDI, S., & KHOSRAVI-DARANI, K. Supplementation of spirulina platensis and chlorella vulgaris algae into probiotic fermented milks. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 12(2), 144–154. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12004>

BEN ATITALLAH, A., BARKALLAH, M., HENTATI, F., DAMMAK, M., BEN HLIMA, H., FENDRI, I., ABDELKAFI, S. Physicochemical, textural, antioxidant and sensory characteristics of microalgae-fortified canned fish burgers prepared

BERTOLDI, F. C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J. L. B. Revisão: Biotecnologia de Microalgas. **B. CEPPA**, Curitiba, vol. 26, n .1, p. 9-20, 2008.

BIRCHLER, J. A.; FRANK, M; HARKESS, A.; WASHBUR, J. **Plant Cell** Oct 2019, 31 (10) 2277-2280; Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00489>

BISHOP, W. & ZUBECK, H. Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutricional Supplements. **Nutricion & Food Sciences** , v2, p147. 2012

BITO T, TANABE T, TANIOKA Y, TAKENAKA S, YABUTA Y, WATANABE F. Determination of vitamin B12 content in 26 types of natural cheeses and identification of vitamin B12 compounds in those cheeses. **Vitamins (in Japanese)** v. 90, p. 390, 2016.

BITO, T., OKUMURA, E., FUJISHIMA, M., & WATANABE, F. Potential of Chlorella as a Dietary Supplement to Promote Human Health. **Nutrients**, v. 12(9), p. 2524, 2020. doi:10.3390/nu12092524

BJCP BEER STYLE GUIDELINES. Brewers Association, 2019

BJCP. **Beer Judge Certification Program.** 2015

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochemystr**; v72(1):p 248-254. 1976.

BRASIL. **Decreto n. 2.314, de 04 de setembro de 1997.** Regulamenta a Lei n. 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.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Instrução Normativa nº 54, de 5 de novembro de 2001.** Estabelece a identidade e qualidade dos produtos de cervejaria destinados ao consumo humano. Diário Oficial da União, Brasília, 6 nov. 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto nº 6.871 de 4 de junho de 2009.** 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. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm#anexo. Acesso em: 20 de jun de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Decreto nº 9.902 de 8 de julho de 2019.** Altera o Anexo ao Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que 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. Disponível em: www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Decreto/D9902.htm#art1 Acesso em: 20 de jun de 2020.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009**. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução RDC nº 64 de 29 de novembro de 2011**. Dispõe sobre a aprovação de uso de coadjuvantes de tecnologia para a fabricação de cervejas. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0064_29_11_2011.htm. Acesso em: 20 de jun de 2020.

BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Resolução RDC nº 65 de 29 de novembro de 2011**. Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para fabricação de cervejas. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res0065_29_11_2011.html Acesso em: 20 de jun de 2020.

BRASIL. **Decreto nº 2.314, 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

BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009**. 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.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing Science and practice**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004.

BRIGIDO, R. V.; NETTO, M. S. **Produção de cerveja**. UFSC. Santa Catarina: 2006.

BRITO, A. Testes mostram que substância modificada em laboratório acelera fermentação da cana: Levedura inteligente acelera produção de álcool. **Jornal da Unicamp**. Campinas, p. 5-5. 20 jul. 2003. Disponível em: http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/jornalPDF/220pag05.pdf. Acesso em: 20/10/2019.

BUCHMANN, L., BRÄNDLE, I., HABERKORN, I., HIESTAND, M., & MATHYS, A. Pulsed electric field based cyclic protein extraction of microalgae towards closed-loop biorefinery concepts. **Bioresource Technology**, 291, 121870. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121870>

BUGGEY, L. A review of polyphenolic antioxidants in hops, brewing and beer. **The Brewer International** v1, p. 21e25. 2001

CALLEJO-LÓPEZ, J. A., RAMÍREZ, M., BOLÍVAR, J., & CANTERO, D. Main

variables affecting a chemical-enzymatic method to obtain protein and amino acids from resistant microalgae. **Journal of Chemistry**, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2019/1390463>

CAPORGNO, M. P., HABERKORN, I., BÖCKER, L., & MATHYS, A. Cultivation of *Chlorella protothecoides* under different growth modes and its utilisation in oil/water emulsions. **Bioresource Technology**, 288(April), 121476. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121476>

CASTELO-BRANCO V.N. & TORRES A.G. Total antioxidant capacity of edible vegetable oils: chemical determinants and association with oil quality. **Rev. Nutr.**, 24: 173-187. 2011.

CEREDA, M.P. **Cervejas**. In: AQUARONE, E.; LIMA, U.A.; BORZANI, W. Alimentos e Bebidas Produzidos por Fermentação. São Paulo, Edgar Blucher, p.3-78, 1983.

CHA K. H.; KOO, S. Y.; LEE, D. U. Antiproliferative effects of carotenoids extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on human colon cancer cells. **J Agric Food Chem** ;v56, p10521–6. 2008.

CHA, K. H., KANG, S. W., KIM, C. Y., UM, B. H., NA, Y. R., & PAN, C. H. Effect of pressurized liquids on extraction of antioxidants from *Chlorella vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(8), 4756–4761. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf100062m>

CHEN, J.; XUAN, Y.; LUO, M.; NI, X.; LING, L.; HU, S.; CHEN, J.; XU, J.; JIANG, L.; SI, W.; XU, L.; GAO, H.; LIU, Z.; LI, H. Kaempferol alleviates acute alcoholic liver injury in mice by regulating intestinal tight junction proteins and butyrate receptors and transporters. **Toxicology**, v. 429, p. 152338, 2019. doi:10.1016/j.tox.2019.152338

CHEN, Y. X., LIU, X. Y., XIAO, Z., HUANG, Y. F., & LIU, B. Antioxidant activities of polysaccharides obtained from *Chlorella pyrenoidosa* via different ethanol concentrations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 505–509. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.05.086>

CHIA, M. A., LOMBARDI, A. T., & MELÃO, M. DA G. G. Growth and biochemical composition of *Chlorella vulgaris* in different growth media. **Anais Da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85(4), p. 1427–1438. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201393312>

Chlorella suppresses methylmercury transfer to the fetus in pregnant *Chlorella* suppresses methylmercury transfer to the fetus in pregnant mice. **J. Toxicol. Sci.**, v 36, p. 675–680, 2011.

CIMINI, A.; DE FRANCESCO, G.; PERRETTI, G. Effect of crossflow microfiltration on the clarification and stability of beer from 100% low-b-glucan barley or malt. **LWT - Food Science and Technology**. v. 86, p. 55-61, 2017.

COELHO, D., LOPES, P. A., CARDOSO, V., PONTE, P., BRÁS, J., MADEIRA, M. S., PRATES, J. A. M. Novel combination of feed enzymes to improve the degradation of *Chlorella vulgaris* recalcitrant cell wall. **Scientific Reports**, v. 9(1), p. 1–11. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41775-0>

CRAUWELS, S., STEENSELS, J., AERTS, G., WILLEMS, K. A., VERSTREPEN, K. J., & LIEVENS, B. *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. **Brewing Science**, v. 68, p. 110–121, 2015.

DE FRANCESCO, G., BRAVI, E., SANARICA, E., MARCONI, O., CAPPELLETTI, F., & PERRETTI, G. (2020). Effect of Addition of Different Phenolic-Rich Extracts on Beer Flavour Stability. **Foods**, v. 9(11), p. 1638, 2020. doi:10.3390/foods9111638

DE LUNA FREIRE, K. R.; SOUZA, A. F.; MORAES, F. S.; CAVALCANTI, T. G.; SANTOS, A. A. O.; PAULINO, F. DE O. **Processo produtivo de cerveja com mangaba**. Depositante: Universidade Federal da Paraíba. INPI BR 102018007271-4 A2. Data do depósito: 11/04/2018 Data da publicação: 29/10/2019b.

DE LUNA FREIRE, K. R.; SOUZA, A. F.; MORAES, F. S.; CAVALCANTI, T. G.; SANTOS, A. A. O.; PAULINO, F. DE O. **Processo de produção de cerveja com adição de graviola**. Depositante: Universidade Federal do Paraná. INPI BR 102017024450-4 A2. Data do depósito: 14/11/2017 Data da publicação: 04/06/2019a

DERNER, R. B., OHSE, S., VILLELA, M., DE CARVALHO, S. M., & FETT, R. Microalgae, products and applications. **Microalgas, Produtos e Aplicações**, 36(6), 1959–1967. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782006000600050>

DERNER, R. B.; OHSE, S.; VILLELA, M.; CARVALHO, S. M.; FETT, R. Microalgae, products and applications. **Ciência Rural**, v.36, n.6, 2006. Determination of vitamin B12 content in 26 types of natural cheeses and identification of vitamin B12 compounds in those cheeses. **Vitamins (in Japanese)** v. 90, p. 390, 2016.

DIAS, Rafael Boegershausen. **PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CERVEJA COM SABOR HORTELÃ E PRODUTO RESULTANTE**. BR nº BR102014030280-8 A2, 03 dez. 2014, 28 jun. 2016. RPI, n. 2426.

DIAS, RAFAEL BOEGERSHAUSEN; DIAS, FERNANDO BOEGERSHAUSEN. **Processo de obtenção de cerveja com sabor hortelã e produto resultante**. INPI BR 10 2014 030280 8 A2. Data do depósito: 03/12/2014. Data da publicação: 28/06/2016.

DINIZ G. S. Gross chemical profile and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for five tropical seaweeds. **Am J Plant Sci**. v02, p 287–96. 2011.

DINIZ, Y.S. Toxicity of hipercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. **Food and Chemic. Toxicol.** v42, p313-319. 2004.

DRAGONE, G.; SILVA, J. B. A., VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas: Ciência e Tecnologia.** São Paulo: Blücher, 2010.

DUAN, R.; ZHANG, J. J.; LIU, L. P.; CUI, W. Z; REGENSTEIN, J. M. The functional properties and application of gelatin derived from the skin of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Chemistry** v239, 464-469. 2018

EBRAHIMI-MAMEGHANI, M.; SADEGHI, Z.; FARHANGI, M.A.; VAGHEF-MEHRABANY, E.; ALIASHRAFI, S. Glucose homeostasis, insulin resistance and inflammatory biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Beneficial effects of supplementation with microalgae *Chlorella vulgaris*: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. **Clin. Nutr.**, v. 36, p. 1001–1006, 2017.

EL-FAYOUMY, E. A.; SHANAB, S. M. M.; GABALLA, H. S.; TANTAWY, M. A.; SHALABY, E. A. Evaluation of antioxidant and anticancer activity of crude extract and diferente fractions of *Chlorella vulgaris* axenic culture grown under various concentrations of copper ions. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, 21:51,2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12906-020-03194-x> Acesso em: 30 de mai de 2021.

FELLER, R.; MATOS, Â.P.; MAZZUTTI, S.; MOECKE, E.H.S.; TRES, M.V.; DERNER, R.B.; OLIVEIRA, J.V.; JUNIOR, A.F. Polyunsaturated W-3 and W-6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ and subcritical n-butane. **J. Supercrit. Fluids**, v. 133, p. 437–443, 2018.

FERNANDES, A. M., & FRANZEN, T. *Automação e Controle em uma Micro Cervejaria Artesanal.* 13. 2011.

FERNANDES, B. Starch determination in *Chlorella vulgaris*-a comparison between acid and enzymatic methods. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 5, p. 1203-1208, 2012.

FERREIRA-HERMOSILLO, A., TORRES-DURAN, P. V., & JUAREZ-OROPEZA, M. A. Hepatoprotective effects of *Spirulina maxima* in patients with non-alcoholic fatty liver disease: A case series. **Journal of Medical Case Reports**, 4, 1–5. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1752-1947-4-103>

FIGUEIRA, F. D. S.; CRIZEL, T. D. M.; SILVA, C. R.; SALAS, M. M. Pão sem glúten enriquecido com a microalga *Spirulina platensis*. **Brazilian Journal of Food Technology**, v14 (4), p308–316, 2011.

FORSTER, A. Hop fenpolyphenole mehrals nur TruÈbungsbildner in Bier',**Hop fenrundschau International**, p. 68±74.1999

FRADIQUE, MÓNICA, BATISTA, A. P., NUNES, M. C., GOUVEIA, L., BANDARRA, N. M., & RAYMUNDO, A. Incorporation of *Chlorella vulgaris* and *Spirulina maxima* biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90(10), 1656–1664. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.3999>

FRAGOSO, S. P. **Desenvolvimento de bolachas com incorporação de diferentes microalgas**. 2016. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade de Lisboa.

FRUMENTO, D., CASAZZA, A. A., AL ARNI, S., & CONVERTI, A. Cultivation of *Chlorella vulgaris* in tubular photobioreactors: A lipid source for biodiesel production. **Biochemical Engineering Journal**, 81, 120–125. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2013.10.011>

GABAN, S. V. F.; PEREIRA, I. M. C.; NETO, J. D. M. **Cerveja adicionada de casca de laranja (*Citrus sinensis*) e pendúnculo de caju (*Anacardium occidentale*)**. Depositante: Universidade Federal do Ceará. INPI BR 102017001261-1 A2. Data de depósito: 20/01/2017 Data de publicação: 22/01/2019.

GIANNAKOU, K.; VISINONI, F.; ZHANG, P.; NATHOO, N.; JONES, P.; COTTERRELL, M.; VRHOVSEK, U.; DELNERI, D. Biotechnological exploitation of *Saccharomyces jurei* and its hybrids in craft beer fermentation uncovers new aroma combinations. **Food Microbiology**, v. 100, p. 103838, 2021.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnology**, v15, p.401-409, 1997.

GOBERT, A., TOURDOT-MARÉCHAL, R., SPARROW, C., MORGE, C., & ALEXANDRE, H. (2019). Influence of nitrogen status in wine alcoholic fermentation. **Food Microbiology**, 2019. doi:10.1016/j.fm.2019.04.008

GOIRIS, K., MUYLAERT, K., FRAEYE, I., FOUBERT, I., DE BRABANTER, J., & DE COOMAN, L. Antioxidant potential of microalgae in relation to their phenolic and carotenoid content. **Journal of Applied Phycology**, 24(6), 1477–1486. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9804-6>

GONZALEZ VIEJO, C., FUENTES, S., TORRICO, D., HOWELL, K., & DUNSHEA, F. R. Assessment of beer quality based on foamability and chemical composition using computer vision algorithms, near infrared spectroscopy and machine learning algorithms. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98(2), 618–627. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8506>

GOUVEIA, L., G. CHOUBERT, E. GOMES, N. PEREIRA, J. SANTINHA, AND J. EMPIS. Pigmentation of gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.1875) using *Chlorella vulgaris* (Chlorophyta, Volvocales) microalga. **Aquaculture Research** v33, p987–993. 2002.

GOUVEIA, L., RAYMUNDO, A., BATISTA, A. P., SOUSA, I., & EMPIS, J. *Chlorella*

vulgaris and Haematococcus pluvialis biomass as colouring and antioxidant in food emulsions. **European Food Research and Technology**, 222(3–4), 362–367. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-005-0105-z>

GOUVEIA, L., VELOSO, V., REIS, A., FERNANDES, H., NOVAIS, J. & EMPIS J. Evolution of pigment composition in Chlorella. **Bioresource Technology**, v57, p157-163. 1996.

GRAÇA, C., FRADINHO, P., SOUSA, I., & RAYMUNDO, A. Impact of Chlorella vulgaris on the rheology of wheat flour dough and bread texture. **LWT - Food Science and Technology**, 89(July 2017), 466–474. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.024>

GRANT, H. L. Lúpulo. In: BRODERICK, H. M. (Dir.). El cervecero en la practica: un manual para la industria cervecera. 2. ed. Lima: Graficas SUR, 1977. cap. 8, p. 164-88.

GUERDRUM, L. J., & BAMFORTH, C. W. Prolamin levels through brewing and the impact of prolyl endoproteinase. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, 70(1), 35e38. 2012.

Guido, L.F. Sulfites in beer: Reviewing regulation, analysis and role. **Sci. Agric. V.** 73, p. 189–197, 2016.

GUZMAN, A.; GATO, M.; LAMELA, M.; FREIRE-GARABAL J. M. CALLEJA, Antiinflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from Chlorella stigmatophora and Phaeodactylum tricornutum, **Phytother Res** v17, p665-670. 2003.

HAJIMAHMOODI, M., FARAMARZI, M. A., MOHAMMADI, N., SOLTANI, N., OVEISI, M. R., & NAFISSI-VARCHEH, N. Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. **Journal of Applied Phycology**, 22(1), 43–50. 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>

HIDALGO-LUCAS, S., ROZAN, P., GUÉRIN-DEREMAUX, L., BAERT, B., VIOLLE, N., SANIEZ-DEGRAVE, M. H., & BISSON, J. F. Benefits of Preventive Administration of Chlorella sp. on Visceral Pain and Cystitis Induced by a Single Administration of Cyclophosphamide in Female Wistar Rat. **Journal of Medicinal Food**, 19(5), 450–456. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/jmf.2015.0077>

HIRAHASHI, T.; MATSUMOTO, M.; HAZEKI, K.; SAEKI, Y.; UI, M.; SEYA, T. Activation of the human innate immune system by Spirulina: Augmentation of interferon production and NK cytotoxicity by oral administration of hot water extract of Spirulina platensis. **International Immunopharmacology**, v2 (4), p. 423-434, 2002.

HOLT, S.; MUKHERJEE, V.; LIEVENS, B.; VERSTREPEN, K. J.; THEVELEIN, J.M. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. **Food Microbiology**, v. 72, p. 55-66, 2018.

HOWE, S. **Raw Materials**. United Kingdom: Elsevier, 2020, pag. 403.

HUANG, Y., ZHANG, D., XUE, S., WANG, M., & CONG, W. The Potential of Microalgae Lipids for Edible Oil Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180(3), p. 438–451, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2108-6>

HUGHES, P. S.; SIMPSON, W. J. **Production and composition of hop products**. 1993.

HUGHES, P. The significance of iso- α -acids for beer quality e Cambridge prize paper. **Journal of the Institute of Brewing**, v.106, p. 271-276, 2000.

IGUAL, M.; URIBE-WANDARRAGA, Z. N.; GÁRCIA-SEGOVIA, P., MARTÍNEZ-MONZÓ, J. Microalgae-enriched breadsticks: Analysis for vitamin C, carotenoids, and chlorophyll a. **Food Science and Technology**. International 0(0) 1–6, 2021.

ILAVENIL, S., KIM, D. H., VIJAYAKUMAR, M., SRIGOPALRAM, S., ROH, S. G., ARASU, M. V., CHOI, K. C. Potential role of marine algae extract on 3T3-L1 cell proliferation and differentiation: An in vitro approach. **Biological Research**, v.49(1), p. 1–11. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40659-016-0098-z>

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físicos-Químicos Para Análise de Alimentos**. 2008

JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; QUEIROZ, M. I.; NETTO, F. M. Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscopica nãgeli* cultivada no efluente da parboilização do arroz. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, vol. 26, n. 2, p. 482-488, 2006.

KHAN, M.I.; SHIN, J.H.; KIM, J.D. **MICROB. Cell Fact.** v. 17, p. 1–21, 2018.

KIM, H. K. Protective Effects of *Chlorella vulgaris* Extract on Carbon Tetrachloride-induced Acute Liver Injury in Mice. **Food Science and biotechnology**, v. 18, p. 1186-1192, 2009.

KIM, J.H., KIM, S.M., CHA, K.H., MOK, I., KOO, S.Y., PAN, C., LEE, J.K. Evaluation of the anti-obesity effect of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. **Appl. Biol. Chem.**, v. 59, p. 283–290, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13765-016-0151-1>. Acesso em: 16 de nov. de 2019.

KIM, K. A., CHA, K. H., CHOI, S. J., PAN, C. H., & JUNG, S. H. The extract of *Chlorella vulgaris* protects transformed retinal ganglion cells from oxidative stress-induced cells death. **Journal of Food Biochemistry**, v. 38(2), p. 129–139, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12030>

KOBAYASHI, M., SHIMIZU, H. & SHIOYA, S. 2008. Beer volatile compounds and their application to low-malt beer fermentation. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 106, p. 317-323. 2008.

KONG, W., YANG, S., WANG, H., HUO, H., GUO, B., LIU, N., ZHANG, A.; NIU, S. Regulation of biomass, pigments, and lipid production by *Chlorella vulgaris* 31 through controlling trophic modes and carbon sources. **Journal of Applied Phycology**, 2020. doi:10.1007/s10811-020-02089-1

KUMARI, A., PATHAK, A. K., & GURIA, C. Cost-Effective Cultivation of *Spirulina platensis* Using NPK Fertilizer. **Agricultural Research**, v. 4(3), p. 261–271, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40003-015-0168-4>

KURD, F.; SAMAVATI, V. Water soluble polysaccharides from *Spirulina platensis*: Extraction and in vitro anti-cancer activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v74, p. 498-506, 2015.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227(5259), p. 680-685, 1970.

LAI, Y. C., CHANG, C. H., CHEN, C. Y., CHANG, J. S., & NG, I. S. Towards protein production and application by using *Chlorella* species as circular economy. **Bioresource Technology**, v. 289(June), 121625. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121625>

LAI, Y.-C., CHANG, C.-H., CHEN, C.-Y., CHANG, J.-S., & NG, I.-S. Towards protein production and application by using *Chlorella* species as circular economy. **Bioresource Technology**, v. 289, p. 121625, 2019. doi:10.1016/j.biortech.2019.121625

LARROQUE, M. N.; CARRAU, F.; FARINÃ, L.; BOIDO, E.; DELLACASSA, E.; MEDINA, K. Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v. 337, p. 108953, 2021.

LEE, H., CHOI, C., CHO, C., & SONG, Y. Attenuating Effect of *Chlorella* Supplementation on Oxidative Stress and NFκB Activation in Peritoneal Macrophages and Liver of C57BL/6 Mice Fed on an Atherogenic Diet. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 67(10), p. 2083–2090, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1271/bbb.67.2083>

LEE, P. R., ONG, Y. L., YU, B., CURRAN, P., & LIU, S. -Q. Evolution of volatile compounds in papaya wine fermented with three *Williopsis saturnus* yeasts. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45(10), p. 2032–2041, 2010.

LEIPER, K. A., MIEDL, M. Colloidal stability of beer. In: BAMFORTH, C. W. Beer: a Quality Perspective. **Burlington: Academic Press**. cap. 4, p. 111-161. 2009

LEIPER, K.A., STEWART, G.G., MCKEOWN, I.P. Beer polypeptides and silica gel. **J. Inst. Brew.** v. 09, p. 57-79, 2003

LEMES, A. C.; TAKEUCHI, K. P.; DE CARVALHO, J. C. M.; DANESI, E. D. G. Fresh pasta production enriched with *Spirulina platensis* biomass. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55 (5), p. 741-750, 2012.

LENTZ, M., & HARRIS, C. Analysis of growth inhibition and metabolism of hydroxycinnamic acids by brewing and spoilage strains of *Brettanomyces* yeast. **Foods**, v. 4(4), p. 581–593, 2015.

LEONARD, W.; ZHANG, P.; YING, D.; ADHIKARI, B.; FANF, Z. Fermentation transforms the phenolic profiles and bioactivities of plant-based foods. **Journal Biotechnology Advances**, v. 49, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107763> Acesso em: 10 de jun. de 2021.

LI, Y., CHEN, Y.F., CHEN, P., MIN, M., ZHOU, W., MARTINEZ, B., ZHU, J., RUAN, R. Characterization of a microalga *Chlorella* sp. well adapted to highly concentrated municipal wastewater for nutrient removal and biodiesel production. **Bioresour. Technol.**, v. 102 (8), p. 5138–5144, 2011.

LIANG, S.; LIUX, C.C. Current microalgal health food e activities in China. Asian pacific phycology in the 21st century: prospects and challenges. **Netherlands:Springer**; .p.45–8. 2004.

LIANG, S.; LIUX.; FENG C.; ZIJIAN C. Current microalgal health food R & D activities in China. **Hydrobiology**, p. 45-48, 2004.

LIMA, ANDRESSA KELLY DE SANTOS. **Cerveja enriquecida com ômega-3, que promove a saúde do coração**. INPI PI 1102094 6. Data do depósito: 31/05/2011. Data da publicação: 09/07/2013.

LIMA, L. L. A.; FILHO, A. B. M. **Técnico em alimentos: tecnologia de bebidas**. 2011.

LIMA, U. A., BASSO, L. C., AMORIM, H. V.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. (Coord.). **Biotechnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**, v.3, capítulo 1, São Paulo, SP, Editora Edgard Blucher, 2001.

LIU, S. Q; QUEK, A. Y. H. Evaluation of beer fermentation with a novel yeast *Williopsis saturnus*. **Food Technol. Biotechnol.** v. 54 (4), p. 403-412, 2016.

LOPEZ, C. V.; GARCIA, M. DEL C.; FERNANDEZ, F. G.; BUSTOS, C. S.; CHISTI, Y.; SEVILLA, J. M. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. **Bioresour Technol**; v. 101, p. 7587–91, 2010.

LORDAN, S.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. **Mar Drugs**, v. 9(6): p. 1056-1100, 2011.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas - princípios e aplicações**. São Carlos: RiMa, 2006.

LUDWIG, K.M.; OLIVA-NETO, P.; ANGELIS, D.F. de. Quantificação da Flocculação de *Saccharomyces cerevisiae* por bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v. 21, n. 1, p. 63-68, 2001.

MANGAN, K. C.S.; DAS, A. J.; DEKA, S. C. Shelf life improvement of rice beer by incorporation of albizia myriophylla extracts. **Journal of Food Processing and Preservation**, 2016.

MARCUSSO, E. F., & MÜLLER, C. V. A CERVEJA NO BRASIL: O ministério da agricultura informando e esclarecendo. **Revista MAPA, Online**, 1–5. 2017. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/@@download/file/A CERVEJA NO BRASIL-28.08.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/a-cerveja-no-brasil-28-08.pdf/@@download/file/A%20CERVEJA%20NO%20BRASIL-28.08.pdf)

MARTINS, S.M. **Como Fabricar Cerveja**. 2 ed., São Paulo: Ícone Editora, 1991, p. 77.

MATOS, J., CARDOSO, C. L., FALÉ, P., AFONSO, C. M., & BANDARRA, N. M. Investigation of nutraceutical potential of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. **International Journal of Food Science & Technology**, 2019. doi:10.1111/ijfs.14278

MATOS, J., CARDOSO, C. L., FALÉ, P., AFONSO, C. M., & BANDARRA, N. M. Investigation of nutraceutical potential of the microalgae *Chlorella vulgaris* and *Arthrospira platensis*. **International Journal of Food Science and Technology**, 1–10. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/ijfs.14278>

MEILGAARD, M; CIVILLE, G. V. AND CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques**. 4th Edition, CRC Press, Boca Raton, 2007.

MERCHANT, R.E.; PHILLIPS, T.W.; UDANI, J. Nutritional supplementation with *Chlorella pyrenoidosa* lowers sérum methylmalonic acid in vegans and vegetarians with a suspected vitamin B12 deficiency. **J. Med. Food**, v.18, p. 1357–1362, 2015.

MIAO, M. SHENG, YAO, X. DONG, SHU, L., YAN, Y. JIE, WANG, Z., LI, N., KONG, Q. (2016). Itivated with synthetic domestic wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 113, p. 120–125. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.04.005>

MILLER, L. A. H. J. A. The micro-kjeldahl determination of the nitrogen content of amino acids and proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.159, p.373-383, 1945.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA. **Anuário da Cerveja 2019**. Brasília: MAPA, 2020.

MOLINO, A., IOVINE, A., CASELLA, P., MEHARIYA, S., CHIANESE, S., CERBONE, A., ... MUSMARRA, D. Microalgae characterization for consolidated and new application in human food, animal feed and nutraceuticals. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15(11), p. 1–21. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijerph15112436>

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. 1ª Ed. São Paulo: Larousse do Brasil, 2009. P. 357.

MORAIS, M. G.; MIRANDA, M. Z.; COSTA, J. A. V. Biscoitos de chocolate enriquecidos com *Spirulina platensis* : Características físico-químicas, sensoriais e digestibilidade. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.17 (3), p.323–328, 2006.

MORRIS H.J., CARRILLO O.V., ALONSO M.E., BERMÚDEZ R.C., ALMARALES A., LLAURADÓ G., LEBEQUE Y., FONTAINE R., Oral administration of an enzymatic protein hydrolysate from the Green Microalga *Chlorella vulgaris* enhances the nutritional recovery of malnourished mice. **J. Medic. Food**, v. 14(12), p. 1583–1589, 2011.

MORRIS, H.J.; CARRILLO, O. V.; ALMARALES, A.; BERMUDEZ, R. C.; ALONSO, M. E.; BORGES, L.; QUINTANA, M. M.; FONTAINE, R.; LIAURADO, HERNANDEZ, G. M. Protein hydrolysates from the alga *Chlorella vulgaris* with potentialities in immunonutrition. **Biotechnology**, v.26(2), p.162- 165, 2009.

MOURET, J., CADIÈRE, A., AGUERA, E., ROLLERO, S., ORTIZ-JULIEN, A., SABLAYROLLES, J. & DEQUIN, S. Dynamics and quantitative analysis of the synthesis of fermentative aromas by an evolved wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**, v. 32, p. 257-269, 2015

MUÑOZ-PEÑUELA, M., RAMÍREZ-MERLANO, J. A., OTERO, A. M. P., MEDINA-ROBLES, V. M., CRUZ-CASALLAS, P. E., & VELASCO-SANTAMARÍA, Y. M. Effect of culture medium on growth and protein content of *Chlorella vulgaris*. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 25(3), p. 438–449, 2012.

MUTZ, Y. S.; ROSARIO, D.; SILVA, L. R. G.; SANTOS, F. D.; SANTOS, L. P.; JANEGITZ, B. C.; FILGUERAS, P. R.; ROMÃO, W.; FERREIRA, R. DE Q.; CONTE-JUNIOT, C.A. Portable electronic tongue based on screen-printed electrodes coupled with chemometrics for rapid differentiation of Brazilian lager beer. **Food Control**, v.127, p. 108163, 2021.

NAGAYAMA, J., NODA, K., UCHIKAWA, T., MARUYAMA, I., SHIMOMURA, H., & MIYAHARA, M. Effect of maternal *Chlorella* supplementation on carotenoid concentration in breast milk at early lactation. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65(5), p. 573–576, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.898257>

NEUMANN, P. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutraceuticos....você já ouviu falar? **Higiene Alimentar**, v.14, p.19-23, 2000.

NICCOLAI, A., CHINI ZITTELLI, G., RODOLFI, L., BIONDI, N., & TREDICI, M. R. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. **Algal Research**, v. 42(April), p. 101617, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101617>

NOGUCHI, N., MARUYAMA, I., YAMADA, A. The influence of chlorella and its hot water extract supplementation on quality of life in patients with breast cancer. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/704619>

CERVBRASIL. O mercado da cerveja em foco. v. 10, p. 1–8. 2016.

OLIVEIRA, A. M. de. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja.** 2011. 45 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Ambiental e Industrial) - Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. 2011.

ORTIZ MONTOYA, E. Y., CASAZZA, A. A., ALIAKBARIAN, B., PEREGO, P., CONVERTI, A., & DE CARVALHO, J. C. M. Production of *Chlorella vulgaris* as a source of essential fatty acids in a tubular photobioreactor continuously fed with air enriched with CO₂ at different concentrations. **Biotechnology Progress**, v. 30(4), p. 916–922, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/btpr.1885>

OSUKI, T.; SHIMIZU, K.; IEMITSU, M.; KONO, I. Multicomponent supplement containing *Chlorella* decreases arterial stiffness in healthy young men. **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 53, p. 166–169, 2013

OTHMAN, R., NOH, N., NURRULHIDAYAH, A. F., ANIS HAMIZAH, H., & JAMALUDIN, M. A. Determination of natural carotenoid pigments from freshwater green algae as potential halal food colorants. **International Food Research Journal**, v. 24, p. 468–471, 2017.

PANAHI, Y.; MOSTAFAZADEH, B.; ABRISHAMI, A.; SAADAT, A.; BEIRAGHDAR, F.; TAVANA, S.; PISHGOO, B.; PARVIN, S.; SAHEBKAR, A. Investigation of the Effects of *Chlorella vulgaris* Supplementation on the Modulation of Oxidative Stress in Apparently Healthy Smokers. **Clinical Laboratory** v. 59, p. 579-587, 2013.

PEIXOTO, F.C. **Processo para produção de cerveja com substituição total ou parcial do lúpulo de amargor por pau.** INPI BR 10 2013 029270 2. Data do depósito: 13/11/2013. Data da publicação: 06/10/2015.

PÉREZ-LLORÉNS, J. L. Microalgae: From staple foodstuff to avant-garde cuisine. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 21, p. 100221, 2020.

PERYAM, D.R.; PILGRIM, F.J. Hedonic scale method of measuring food preferences. **Food Technology**, v. 11, n. 9, p. 9-14, 1957.

PHILPOTT, J.; TAYLOR, D. M.; WILLIAMS, D. R. Critical assessment of factors affecting the accuracy of the IoB Bitterness Method. **Journal of American Society**

of **Brewing Chemists**. v. 55, n. 3, p. 103-106, 1997.

PHONG, W. N., SHOW, P. L., LE, C. F., TAO, Y., CHANG, J. S., & LING, T. C. Improving cell disruption efficiency to facilitate protein release from microalgae using chemical and mechanical integrated method. **Biochemical Engineering Journal**, 135, 83–90. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.04.002>

PICCINI, A. R.; MORESCO, C.; MUNHOS, L. **Tipos de Fermentação**. 2002.

PLAZA, M., SANTOYO, S., JAIME, L., AVALO, B., CIFUENTES, A., REGLERO, G., IBÁÑEZ, E. Comprehensive characterization of the functional activities of pressurized liquid and ultrasound-assisted extracts from *Chlorella vulgaris*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 46(1), p. 245–253, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.09.024>

PONCE DE LEÓN, C. A.; BAYON, M. M.; PAQUIN, C; CARUSO, J. A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. **Journal Applied Microbiology**. v. 92(4), p. 602-10, 2002.

PRIEST, F.G.; STEWART, G.G. 2006. **Handbook of Brewing**. New York, Taylor & Francis Group, 829 p.

PRIOR, R.L.; WU, X. & SCHAICH. K. Standardized methods for the determination of antioxidante capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 53, p. 4290- 4302, 2005.

PULZ, O.; GROSS, W. Valuable products from biotechnology of microalgae. **Appl Microbiol Biotechnology**; v. 65(6), p. 635-648, 2004.

QIAN ZJ.; JUNG; WK; KIM, SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. **Bioresour Technol.**, v. 99, p. 1690-8, 2008.

QUEM SOMOS. **ACervA Brasil – Federação Brasileira das ACervAs**. Disponível em: <https://acervabrasil.com.br/quem-somos/> acesso em: 25 de mai de 2021.

QUINTERO-DALLOS, V., GARCÍA-MARTÍNEZ, J. B., CONTRERAS-ROPERO, J. E., BARAJAS-SOLANO, A. F., BARAJAS-FERRERIRA, C., LAVECCHIA, R., & ZUORRO, A. Vinasse as a Sustainable Medium for the Production of *Chlorella vulgaris* UTEX 1803. **Water**, v. 11(8), p. 1526. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/w11081526>

RAJA, R.; HEMAI SWARYA, S.; RENGASAMY, R. Exploitation of *Dunaliella* for β -carotene production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** V. 74, p. 517–523, 2007.

RATOMSKI, P.; HAWROT-PAW, M. Production of *Chlorella vulgaris* Biomass in Tubular Photobioreactors during Different Culture Conditions. **Appl. Sci.**, v.11, p. 3106, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11073106>

REGULAMENTO (UE) Nº 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho de 27 de janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares.

RODRÍGUEZ DE MARCO, E.; STEFFOLANI, M. E.; MARTÍNEZ, C. S.; LEÓN, A. E. Effects of Spirulina biomass on the technological and nutritional quality of bread wheat pasta. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58 (1), p. 102–108, 2014.

RODRIGUEZ-GARCIA, I., & GUIL-GUERRERO, J. L. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. **Food Chemistry**, v. 108(3), p. 1023–1026, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.059>

ROUXEL, C.; DANIEL, A.; JERONE, M.; ETIENNE, M.; FLEURENCE, J. Species identification by SDS-PAGE of red algal used as seafood or a food ingredient. **Food Chemistry**, v. 74, p. 349-353, 2001.

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

RYU, N.H.; LIM, Y.; PARK, J.E.; KIM, J.; KIM, J.Y.; KWON, S.W.; KWON, O. Impact of daily Chlorella consumption on serum lipid and carotenoid profiles in mild hypercholesterolemic adults: A double-blinded, randomized, placebo-controlled study. **Nutr. J.**, v. 13, p. 57, 2014.

SABERI, A., ZORRIEHZAHRA, M. J., EMADI, H., KAKOOLAKI, S., & FATEMI, S. M. R. Effects of Chlorella vulgaris on blood and immunological parameters of Caspian Sea salmon (*Salmo trutta caspius*) Fry exposed to Viral Nervous Necrosis (VNN) virus. **Iranian Journal of Fisheries Sciences**, v. 16(2), p. 494–510, 2017.

SAFI, C., CHARTON, M., PIGNOLET, O., SILVESTRE, F., VACA-GARCIA, C., & PONTALIER, P. Y. Influence of microalgae cell wall characteristics on protein extractability and determination of nitrogen-to-protein conversion factors. **Journal of Applied Phycology**, v. 25(2), p. 523–529, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9886-1>

SANSAWA, H.; TAKAHASHI, M.; TSUCHIKURA, S.; ENDO, H. Efect of Chlorella and its fractions on blood pressure, cerebral stroke lesions, and life-span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **J. Nutr. Sci. Vitam.**, v. 52, p. 457–466, 2006.

SANTHOSH, S., MANIVANNAN, N., RAGAVENDRAN, C., MATHIVANAN, N., NATARAJAN, D., HEMALATHA, N., & DHANDAPANI, R. Growth optimization, free radical scavenging and antibacterial potential of Chlorella sp. SRD3 extracts against clinical isolates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127(2), p. 481–494, 2019. doi:10.1111/jam.14336

SANTOS DE LIMA, AMAURI FERREIRA. **Cerveja enriquecida com suco ou extrato de blueberry, que combate a obesidade e promove a saúde do coração.**

INPI BR 10 2013 029464 0. Data do depósito: 14/11/2013. Data da publicação: 13/10/2015.

SANTOS, A. F.; SILVA, S. M.; MENDONÇA, R. M. N.; Alterações fisiológicas durante a maturação de pitanga (*Eugenia uniflora* L.). **Proceedings of the Interamericana Society for Tropical Horticulture**, v.46, p.52-54, 2002.

SANTOS, M. S. dos; RIBEIRO, F. de M. **Cervejas e refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005. p. 58. Disponível em: http://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf>. Acessado em: 20 de maio de 2015.

SEBRAE - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. **Microcervejarias**. 1–20. 2016.

SEBRAE. **Potencial de consumo de cervejas no Brasil**: 2014. Disponível em: http://www.sebraemercados.com.br/wpcontent/uploads/2015/12/2014_05_20_RT_Mar_Agrn_Cerveja_pdf.pdf.

SEDIGHI, M., JALILI, H., RANAEI-SIADAT, S. O., & AMRANE, A. Potential health effects of enzymatic protein hydrolysates from *Chlorella vulgaris*. **Applied Food Biotechnology**, v. 3(3), p.160–169. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.22037/afb.v3i3.11306>

SEIDL, C. **O catecismo da cerveja**. São Paulo: SENAC Editora, 385p., 2003.

SENAI. **Conheça a Cerveja**. Rio de Janeiro: Setor de Documentação Bibliográfica do CENATEC de Produtos Alimentares do SENAI - DR/RJ, Vassouras, 1997.

SEYFABADI, J., RAMEZANPOUR, Z., & KHOEYI, Z. A. Protein, fatty acid, and pigment content of *Chlorella vulgaris* under different light regimes. **Journal of Applied Phycology**, v. 23(4), p. 721–726, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10811-010-9569-8>

SIEBERT, K.J. Sensory analysis of hop oil-derived compounds. In: **Quality Control, Eur. Brew. Conv. Monograph XXII, Symposium on Hops, Zouterwoude**, p. 198-215, 1994.

SILVA D. P. **Produção e Avaliação Sensorial de Cerveja Obtida a Partir de Mostos com Elevadas Concentrações de Açúcares**. 2005. 177p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) Departamento de Biotecnologia, FAENQUIL, 2005.

SILVA, FELIPE RODRIGUES DA. **Cerveja energética com álcool ou sem álcool, enriquecida com cafeína, taurina e guaraná microencapsulados** INPI BR 10 2013 029923 5. Data do depósito: 03/12/2013. Data da publicação: 28/06/2015.

SILVA, NELSON JOSÉ DA. **Cerveja com água de coco**. INPI BR 10 2013 021023 4. Data do depósito: 16/08/2013. Data da publicação: 14/07/2015.

SMETANA, S., SANDMANN, M., ROHN, S., PLEISSNER, D., & HEINZ, V. Autotrophic and heterotrophic microalgae and cyanobacteria cultivation for food and feed: life cycle assessment. **Bioresource Technology**, v. 245, p. 162–170, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.113>

SOCCOL, C. R. **Produção de bebida fermentada tipo cerveja base de malte extrato solúvel de carqueja**. Depositante: Universidade Federal do Paraná INPI BR 10 2015 031953 3 A 2. Data do depósito: 18/12/2015. Data da publicação: 12/09/2017.

SOCCOL, C. R.; DE CARVALHO, J. C.; MONTEIRO, A. DE P. **Produção de bebida fermentada tipo cerveja base de malte extrato solúvel de chapéude-couro (echinodorus macrophyllum; echinodorus grandiflorus)**. Depositante: Universidade Federal do Paraná. INPI BR 10 2015 031078 1 A2. Data do depósito: 11/12/2015. Data da publicação: 26/09/2017.

SOCCOL, C. R.; DE CARVALHO, J. C.; MONTEIRO, A. DE P. **Produção de bebida fermentada tipo cerveja base de malte extrato solúvel de ilex spp.** Depositante: Universidade Federal do Paraná. INPI BR 10 2014 031594 2 A2. Data do depósito: 17/12/2014. Data da publicação: 26/02/2019.

SOCCOL, C. R.; DE CARVALHO, J. C.; MONTEIRO, A. DE P. **Produção de bebida fermentada tipo cerveja a base de malte e extrato solúvel de macela (achyrocline satureioides)**. Depositante: Universidade Federal do Paraná. INPI BR 10 2016 006931 9. Data do depósito: 29/03/2016. Data da publicação: 02/05/2018

SOUZA, C. S. **Avaliação da produção de etanol em temperaturas elevadas por uma linhagem de *S.cerevisiae***. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia (USP), Instituto Butantan (IPT), São Paulo, SP, Brasil, 2009.

SOUZA, M. M. **Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da produção de aflatoxina por extratos fenólicos de *Chlorella sp.* e *Spirulina platensis***. 2012. 162. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 2012.

STEWART, G. G. Biochemistry of Brewing. In **Biochemistry of Foods**, 3ed. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-091809-9.00007-8>

TAMJIDI, FARDIN; SHAHED, MOHAMMAD; VARSHOSAZ, JALEH AND NASIRPOUR, A. stability of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers in beverage systems. **Society of Chemical Industry**, v. 98(2), p. 511–518, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jsfa.8488>

TAN, M.; GARO, Y.; SHUM-GHEONG-SING, A.; ROBERT, L.; FRANÇOIS, M.; PETIT, T. Evaluation of mixed-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* with *Saprochaete suaveolens* to produce natural fruity beer from industrial wort. **Food Chemistry**, v. 346, p. 128804. 2021.

TOHAMY, M. M., ALI, M. A., SHAABAN, H. A. G., MOHAMAD, A. G., & HASANAIN, A. M. Production of functional spreadable processed cheese using *Chlorella vulgaris*. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 17(4), p. 347–358, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.17306/J.AFS.2018.0589>

TOZETTO, L. M.. **Produção e caracterização de cerveja artesanal adicionada de gengibre (*Zingiber officinale*)**. *Dissertação de Mestrado Em Engenharia de Produção*. 2017. Disponível em: <http://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/2451>

UNIVERSIDAD MAYOR. **Saponinas de quillaja saponaria molina como estabilizante da espuma de cerveja**. INPI PI 0903559 1. Data do depósito: 24/07/2009. Data da publicação: 06/07/2010.

UCHIKAWA T, MARUYAMA I, KUMAMOTO S, ANDO Y, YASUTAKE A. *Chlorella* suppresses methylmercury transfer to the fetus in pregnant mice. **J Toxicol Sci.**, v. 36, p. 675–680, 2011.

URSU, A. V., MARCATI, A., SAYD, T., SANTE-LHOUELLIER, V., DJELVEH, G., & MICHAUD, P. Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. **Bioresource Technology**, v. 157, p. 134–139, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071>

VENKATARAMAN, V.; PRAKASH, V.; NIRMALA, C. Physico-chemical and functional properties of proteins from spray dried algae (*Spirulina platensis*). **Die Nahrung**, v. 36, p. 569-577, 1992.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas: Bebidas alcoólicas**. v.1. São Paulo: Blucher, 2010.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Cerveja**. Jaboticabal: Funep, 2000, p. 83.

VIEIRA, A. W. **Apostila de produção de cervejas artesanais**. São Paulo: Acerva Paulista, 2009.

VIJAYAVEL, K., ANBUSELVAM, C., & BALASUBRAMANIAN, M. P. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 303(1–2), p. 39–44, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9453-2>. Acesso em: 10 de out. de 2019.

WANG, H.M.; PAN, J. L.; CHEN, C. Y.; CHIU, C. C.; YANG, M. H.; CHANG, H. W.; CHANG, J. S. Identification of anti-lung cancer extract from *Chlorella vulgaris* C-C by antioxidant property using supercritical carbon dioxide extraction. **Process Biochem**, vol. 45, p. 1865- 1872, 2010.

WANG, X., TSANG, Y.F., LI, Y., MA, X., CUI, S., ZHANG, T-A., HU, J., GAO, M-T., Inhibitory effects of phenolic compounds of rice straw formed by saccharification during ethanol fermentation by *Pichia stipitis*. **Bioresource Technology**, 2017.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2017.08.096> Acesso em: 05 de out de 2019.

WATANABE, F.; BITO, T. Vitamin B12 sources and microbial interaction. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, p. 148–158, 2018. DOI: 10.1177/1535370217746612

WHITE, C., & ZAINASHEFF, J. Yeast: The practical guide to beer fermentation. **Boulder: Brewers Publications**. 2010.

WIKFORS, G.H.; OHNO, M. Impact of algal research in aquaculture. **Journal of Physiology**, v. 37, p. 968-974, 2001.

WU, G.; LI, Y.; ZHANG, J.; YUN, W.; XIONG, Z.; YANG, L. Simultaneous and ultra-sensitive detection of Cu²⁺ and Mg²⁺ in wine and beer based on dual DNA tweezers and entropy-driven three-dimensional DNA nanomachine. **Food Chemistry**, v. 358, p. 129835, 2021.

WU, L.C.; HO, J.A.; SHIEH, M.C.; LU, I.W. Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. **J. Agric. Food Chem.** v53, p. 4207–4212, 2005.

WYLER, Patricia. **Influência da madeira de carvalho na qualidade da cerveja**. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Ciências em Tecnologia de Alimentos, Escola Superior de Agricultura (Luiz de Queiroz), 2013.

YATIRAJULA, S. K., SHRIVASTAVA, A., SAXENA, V. K., & KODAVATY, J.. Flow behavior analysis of Chlorella Vulgaris microalgal biomass. **Heliyon**, v. 5(6), p.1845, 2019.

YEH, K. L., & CHANG, J. S. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga Chlorella vulgaris ESP-31. **Bioresource Technology**, v. 105, p. 120–127, 2012.

ZAID, A. A. A.; HAMMAD, D. M.; SHARAF, E. M. Antioxidant and Anticancer Activity of Spirulina platensis Water Extracts. **International Journal of Pharmacology** 11 (7): 846-851, 2015.

ZAPATA, P. J.; MARTÍNEZ-ESLÁ, A.; GIRONÉS-VILAPLANA, A.; LAX, D. S.; ARTIAGA, L. N.; BARRACHINA, A. A. C. Phenolic, volatile, and sensory profiles of beer enriched by macerating quince fruits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 103, p. 139–146, 2019.

ZHANG, Z.D., LIANG, K., LI, K., WANG, G.Q., ZHANG, K.W., CAI, L., CHOU, K.C. Chlorella vulgaris Induces Apoptosis of Human Non-Small Cell Lung Carcinoma (NSCLC) Cells. **Medicinal Chemistry**, v. 13(6), p. 560–568, 2017.

ZHENG, S.-J., WANG, Y.-L., LIU, P. et al. Stable isotope labeling-solid phase extraction-mass spectrometry analysis for profiling

of thiols and aldehydes in beer. **Food Chemistry**, v. 237, p. 399–407, 2017.

ZUPPARDO, B. **Uso da goma Oenogum para a estabilização coloidal e de espuma em cerveja**. *Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura. Piracicaba*. 2010

TSVETKOVA, D; OBRESHKOVA, D; ZHELEVA-DIMITROVA, D.; SASO, L. Antioxidant activity of galantamine and some of its derivatives . **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 4595-4608, 2013.

KASSAN, M.; MONTERO, M. J.; SEVILLA, M. A. In vitro antioxidante activity of pravastatin provides vascular protection. **European Journal of Pharmacology**, v. 630, p. 107-111, 2010.

ADDOLORATO, G.; LEGGIO, L.; FERULLI, A.; GASBARRINI, G. **Beer affects oxidative stress due to ethanol in Beer in health and disease prevention**. Elsevier:London, 2009. p. 459.

HENDERSON G.I.; CHEN J. J.; SCHENKER S. Ethanol, oxidative stress, reactive aldehydes, and the fetus, **Front. Biosci.**, v. 4, p. 541-550, 1999.

LIEBER C. S. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. **Alcohol**, v. 34, p. 9-19, 2004.