

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

Eduarda da Rosa Machado

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA
ARTESANAL COM ADIÇÃO DE CACAU**

Santa Maria, RS

2017

Eduarda da Rosa Machado

DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA ARTESANAL COM ADIÇÃO DE CACAU

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.**

Orientadora: Prof^a Dr.^a Cláudia Kaehler Sautter

Santa Maria, RS
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

da Rosa Machado, Eduarda
DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL
COM ADIÇÃO DE CACAU / Eduarda da Rosa Machado.- 2017.
46 p.; 30 cm

Orientadora: Cláudia Kaehler Sautter
Coorientadora: Marina Venturini Copetti
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2017

1. cacau 2. compostos bioativos 3. bebidas alcoólica
4. análise sensorial I. Kaehler Sautter, Cláudia II.
Venturini Copetti, Marina III. Título.

© 2017

Todos os direitos autorais reservados a Eduarda da Rosa Machado. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

Endereço: Rua 17 de maio, n. 235, ap. 303
Santa maria, RS. CEP 97105070

Fone: (0xx) 55 98108-5301 E-mail: dudaerm@hotmail.com

Eduarda da Rosa Machado

DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA ARTESANAL COM ADIÇÃO DE CACAU

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2017:

Cláudia Kaeller Sautter
(Presidente/orientador)

Daniel Alexandre Neuwald (UHO e KOB)

Mari Silvia Rodrigues de Oliveira (UFSM)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS, VERA E CARLOS, AO MEU
COMPANHEIRO DE VIDA, RICARDO, PELO APOIO, CARINHO,
PACIÊNCIA, MAS PRINCIPALMENTE PELO AMOR EM TODOS
ESSES ANOS.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Gostaria, aqui, neste pedaço de papel, agradecer àqueles que de alguma forma participaram da concretização deste trabalho. De uma maneira especial, agradeço:

- aos meus pais, Carlos e Vera Machado por todo o amor, carinho, compreensão nos finais de semana não comparecidos e a dedicação todos os dias da minha vida. O que sou hoje e o título recebido não existiriam sem vocês;

- ao melhor namorado que a vida poderia me apresentar, Ricardo Scremin Rizzatti, pelas conquistas que obtivemos juntos, pelo companheirismo durante estes quase sete anos de namoro, pela amizade, o amor e por ter sido meu porto seguro nos momentos de tormenta;

- Ao meu irmão, Guilherme da Rosa Machado, por termos nos reencontrado depois de tanto tempo, por ter me dado uma irmã maravilhosa, Franciele Kraetzig, e por vocês terem gerado os melhores sobrinhos que eu poderia sonhar;

- à minha orientadora, prof.^a Dr.^a Cláudia Kaehler Sautter pela oportunidade concedida, pela confiança em mim depositada e a amizade construída;

- à minha coorientadora Marina Venturini Copetti, por toda ajuda no desenvolvimento do projeto;

- aos meus sogros, Maria e Ricardo, meu cunhado Angelo, por me apoiarem e serem meu suporte em Santa Maria que proporcionaram a realização deste trabalho;

- à minha comadre Juciane Prois Fortes por ter sido uma amiga maravilhosa durante a graduação, pós-graduação e para a vida toda, por trabalharmos juntas, pelo afilhado incrível e por hoje sermos uma família;

- às minhas pepinhas, Fernanda Wouters Franco e Cristiane Copetti, pelo apoio, pelas conversas, risadas, puxões de orelha, conselhos, troca de conhecimentos, este trabalho sem vocês não teria se concretizado;

- à minha amiga e colega Laura Gizele Mascarin, por ter sido minha mestre, mentora e amiga durante a jornada acadêmica, pelos conhecimentos passados, mas principalmente por ter se tornado a amiga e exemplo a ser seguido;

- ao amigo Rodrigo Gindri pelo carinho e principalmente por ser o mediador na obtenção do cacau, parte principal deste trabalho;

- às minhas IC's incríveis, Gabriella Moro e Marina Madrid, por terem vestido a camisa e terem trabalhado lado a lado comigo;

- aos estagiários William Nieckel, Yuri Favero e Jean Rocha pelas horas trabalhadas juntos, pelas brincadeiras e pelas risadas;

- aos demais IC's do Lab 114 pelo apoio e ajuda durante a execução deste projeto;

- às colegas pós-graduandos do lab 114, pelo suporte científico e execução deste trabalho;

- à UFSM, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia em alimentos, mas principalmente aos professores e funcionários pelo conhecimento e auxílio no desenvolvimento deste estudo.

- à CAPES pela apoio financeiro.

Por fim, a todos os seres humanos maravilhosos que fazem parte da minha vida e fizeram parte durante o mestrado, e que todo o dia participaram na construção da pessoa que sou.

Só tenho a deixar aqui, o meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Não são nossas habilidades que mostram quem realmente somos. São nossas escolhas.”

Alvo P. W. D. Dumbledore,
segundo J. K. Rolling

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL COM ADIÇÃO DE CACAU

AUTORA: Eduarda da Rosa Machado
ORIENTADORA: Cláudia Kaehler Sautter
CO-ORIENTADORA: Marina Venturini Copetti

A busca por produtos diferenciados tem incentivado a procura de novas matérias-primas fontes de compostos bioativos, assim como características sensoriais a cerveja. Com a grande gama de compostos que podem ser adicionados a produção de cerveja e com as diversas etapas onde podem ser adicionados, criam-se um produto com características peculiares. O objetivo deste trabalho foi avaliar a incorporação de cacau na produção cervejas não pasteurizadas (cervejas) determinando qual etapa tecnológica mais adequada para essa incorporação. Foi também realizada a caracterização do cacau com e sem torrefação, seguido do desenvolvimento de extratos hidroalcoólicos (0%, 4% e 70% de álcool) para serem analisados quanto ao teor de compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante. Foram realizados cinco tratamentos: adição de cacau na brasagem (adição de 2%), na lupulagem (adição de 2% como substituição 100% do lúpulo de amargor), na fermentação (adição de 2%), na maturação (adição de 2%) e cerveja controle. As bebidas foram avaliadas quanto às suas características físico-químicas (teor alcoólico, cor, amargor, extrato real e primitivo, compostos fenólicos, flavonoides e capacidade antioxidante) e avaliadas sensorialmente através de testes afetivos de ordenação de preferência e aceitação. Os extratos com maior teor alcoólico foram os que obtiveram maior valor de compostos fenólicos e flavonoides, porém não diferenciaram significativamente dos demais tratamentos quanto a capacidade antioxidante. As cervejas produzidas com adição de 2% de cacau apresentaram elevadas concentrações de compostos fenólicos e flavonoides. Porém o tratamento que substituiu o lúpulo de amargor apresentou os maiores teores de flavonoides e elevado teor de compostos fenólicos, foi o mais preferido e o mais aceito em todos os atributos da análise sensorial, tornando a melhor opção tecnológica para adição do cacau.

Palavras chave: cacau; compostos bioativos; bebidas alcoólicas; análise sensorial.

ABSTRACT
**DEVELOPMENT OF DRAFT BEER ADDED WITH COCOA: BIOACTIVE
COMPOUNDS AND SENSORY ANALYSIS**

AUTHOR: Eduarda da Rosa Machado
ADVISOR: Cláudia Kaehler Sautter
CO-ADVISOR: Marina Venturini Copetti

The marked demand for differentiated beers has stimulated the search for new raw materials containing bioactive compounds, as well as to enhance sensory characteristics such as taste. A wide range of possible compounds can be added to beer at the various stages during the brewing process, to create a product with unique characteristics. This work evaluated the addition of cocoa to the production of non-pasteurized beers, and determining which production stages was most suitable. Cocoa with and without roasting was characterized by analyzing hydroalcoholic extracts (0, 4 and 70% alcohol) for phenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacity. Five treatments were applied: addition of 2% cocoa during roasting, substitution of hop bitterness, fermentation, maturation and to the draft beer. Beers were evaluated for their physical and chemical characteristics: alcoholic content, color, bitterness, real and primitive extract, phenolic compounds, flavonoids and antioxidant capacity and sensory evaluations were conducted for consumer preference and overall acceptance. The extracts with higher alcohol content were also those with higher phenolic and flavonoids content, but did not differ significantly from the other treatments as the antioxidant capacity. Beers with 2% added cocoa showed the highest concentrations of phenolic and flavonoid content. However, the treatment with 2% substitution of the hop bitterness content had the highest levels of flavonoids, a high phenolic content, and was the most preferred and accepted in the sensory analysis, making it the best option for cocoa addition during the beer production process.

Keywords: phenolic compounds, flavonoids, antioxidant capacity, beer production .

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Composição centesimal das amêndoas de cacau em base seca (g 100 g ⁻¹)	22
Tabela 2 -	Descrição dos tratamentos utilizados na elaboração das cervejas	27
Tabela 3 -	Composição química da amêndoa de cacau base seca (g 100 g ⁻¹)	33
Tabela 4 -	Tabela 4 - análise dos teores de flavonoides, polifenóis e capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos com 2 % de cacau.....	34
Tabela 5 -	Caracterização física das cervejas com adição de 2% de cacau	35
Tabela 6 -	Análise dos teores de flavonoides, polifenóis e capacidade antioxidante de cervejas com adição de 2 % de cacau	36
Tabela 7 -	Aceitabilidade e preferência das cervejas de cacau à 2%	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Variedades do cacau	17
Figura 2 -	Amêndoa torrada de cacau	27
Figura 3 -	Fluxograma de produção de cerveja	29
Figura 4 -	Relação tempo e temperatura empregada na brassagem para a produção das cervejas	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EBC	<i>European Brewerz Convention</i>
% m/m	Percentual massa massa
% m/v	Percentual massa volume
ABTS	ácido 2,2'-azino-bis (3 etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico
DH	desidrogenases
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
g / 100 g	Gramas por 100 gramas
h	horas
HDL	Lipoproteínas de alta densidade
Kcal g⁻¹	Quilocalorias por grama
mg CAT g⁻¹	miligrama de equivalentes catequina por grama
mg CAT L⁻¹	miligrama de equivalentes catequina por litro
mg EAG g⁻¹	miligrama de equivalente em ácido gálico por grama
mg EAG L⁻¹	miligrama de equivalente em ácido gálico por litro
Mg L⁻¹	Miligramas por litro
min	minutos
mmol L⁻¹	Milimol por litro
N	normal
nm	nanômetros
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
rpm	Rotações por minuto
SST	Sólidos solúveis totais
TEAC	capacidade antioxidante equivalente ao Trolox

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 <i>OBJETIVO GERAL</i>	16
2.2 <i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 <i>CERVEJA</i>	17
3.1.1 <i>Água</i>	18
3.1.2 <i>Malte</i>	18
3.1.3 <i>Lúpulo</i>	19
3.1.4 <i>Levedura</i>	20
3.2 <i>CACAU</i>	20
3.2.1 <i>Beneficiamento</i>	21
3.2.2 <i>Composição bromatológica sobre as características nutricionais tecnológicas do cacau</i>	22
3.2.3 <i>Compostos fenólicos</i>	23
3.2.4 <i>Metilxantinas</i>	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 <i>AMOSTRA</i>	26
4.2 <i>DELINEAMENTO EXPERIMENTAL</i>	26
4.3 <i>TORREFAÇÃO DO CACAU</i>	27
4.4 <i>COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CACAU</i>	28
4.5 <i>OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CACAU</i>	28
4.6 <i>PRODUÇÃO DAS CERVEJAS</i>	28
4.7 <i>ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS</i>	30
4.8 <i>CARACTERIZAÇÃO DAS CERVEJAS</i>	32
4.9 <i>AVALIAÇÃO SENSORIAL</i>	33
4.10 <i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i>	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
6 CONCLUSÃO	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

A produção de cerveja no Brasil, de janeiro a dezembro de 2016, totalizou cerca de 12,13 bilhões de litros (CERVBRASIL, 2016). O setor cervejeiro nacional mostra tendência de expansão, com destaque para o segmento das microcervejarias e das cervejarias artesanais (AGÊNCIA BRASIL, 2014). Segundo IBOPE (2013) o Brasil é um dos maiores consumidores de cerveja no mundo, sendo a bebida preferida de quase dois terços dos entrevistados (64%), seguido pelo refrigerante, espumante e vinho com, respectivamente, 13%, 12% e 5% das citações.

O interesse sobre produtos diferenciados, fez com que a produção de cerveja artesanal venha crescendo rapidamente em todo mundo ao longo da última década (KRAFTCHICK, 2014). Em relação ao segmento de microcervejarias, estima-se que existam cerca de 200 microcervejarias, concentradas principalmente nas regiões sul e sudeste do Brasil, e que representam ainda menos de 1% do setor cervejeiro nacional. Esse segmento apresenta tendência de crescimento e deve atingir 2% da fatia do mercado de cervejas em dez anos, motivada pela busca por parte dos consumidores de satisfação sensorial e favorecida pela melhoria na renda da população brasileira (ABRABE, 2015).

Estima-se que existam atualmente mais de 20 mil diferentes formulações de cervejas no mundo. Esta grande variedade é obtida a partir de mudanças nas etapas de fabricação da bebida, tais como o tempo e temperatura nas etapas de mosturação, fermentação, maturação e o uso de ingredientes diferenciados como trigo, milho, centeio, arroz, mel, mandioca, frutas, dentre outros. e que podem modificar o sabor do produto final (CARVALHO, 2007; SOARES, 2011). Há estudos que comprovam que a adição de outros ingredientes na fabricação de cerveja agrega compostos bioativos, aumentando o valor nutricional do produto final. Rio (2013) desenvolveu uma cerveja com adição de gengibre e hortelã e obteve aumento de 6,85% no conteúdo de compostos fenólicos. Neste mesmo contexto Ducret (2017) acrescentou *gojiberry* na sua formulação e obteve aumento significativo na capacidade antioxidante das cervejas e cerca de 2 vezes o teor de compostos fenólicos.

Os principais componentes nutricionais das amêndoas de cacau são a gordura, carboidratos e proteínas, mas além destes contém também uma gama de compostos bioativos como várias enzimas, vitaminas, esteróis, fosfolípidios, fibras dietéticas,

minerais (K, Mg, Cu, Fe, P), metilxantinas (cafeína e teobromina) e compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides).

O cacau é a principal fonte natural de teobromina, mas em relação a cafeína quando comparado ao café, chá, produtos de cacau e chocolate, têm um conteúdo muito menor e apenas vestígios de teofilina (TOCOROVIC, 2015). Estes compostos foram associados com alguns efeitos fisiológicos em vários sistemas corporais, incluindo os sistemas nervoso central, gastrointestinal, respiratório e renal (LI, 2012).

Os compostos fenólicos do cacau dividem-se em muitas classes de moléculas, como as catequinas, epicatequinas, antocianinas, pró-antocianidinas, ácidos fenólicos, taninos condensados e outros flavonoides (ARLORIO, 2005).

Há diversas cervejas no mercado que são produzidos com a adição de cacau, porém ainda não foram encontrados estudos sobre as propriedades químicas e tecnológicas destas cervejas. Assim como os compostos bioativos que possivelmente possam ser incorporados.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma cerveja artesanal adicionado de cacau e verificar suas características físico- químicas e sensoriais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as perdas nutricionais do processo de torrefação da amêndoa.
- Avaliar o potencial de contribuição do cacau na incorporação de compostos bioativos.
- Determinar as características físico-químicas e da incorporação de amêndoa torrada de cacau na cerveja.
- Verificar as características sensoriais do produto obtido
- Identificar a melhor etapa de adição de amêndoa de cacau torrada, frente as características físico-químicas, tecnológicas e sensoriais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 CERVEJA

A cerveja tem sido consumida há milhares de anos e pode ser definida como a bebida resultante, exclusivamente, da fermentação alcoólica do malte e água potável, submetido ao processo de cocção com a presença de lúpulo, mediante ação de levedura cervejeira. A cerveja não estabilizada microbiologicamente no envase é denominada chope ou chopp (BRASIL, 2009).

Devido à sua capacidade antioxidante e baixo teor alcoólico ($\geq 8\%$), a cerveja é capaz de melhorar a atividade antioxidante do plasma, reduzindo o risco de doenças coronarianas, sem apresentar os aspectos negativos produzido por altas doses de etanol (GHISELLI, 2000).

A cerveja pode ser classificada quanto ao extrato primitivo, a cor, álcool e proporção de malte de cevada na composição (em peso sobre o extrato primitivo). Quanto ao extrato primitivo em peso, a cerveja pode ser leve quando seu valor estiver entre 5 % e 10,5 %, comum entre 10,5 % e 12,5 %, extra entre 12,5 % e 14,0 % e forte quando seu valor de extrato primitivo por superior a 14 % em peso (BRASIL, 2009).

A classificação segundo a cor está de acordo a *European Brewers Convention* (EBC) e é determinada em unidades EBC. A cerveja clara é a que apresentar cor correspondente a menos de 20 unidades EBC e cerveja escura a cerveja que apresentar cor correspondente a 20 ou mais unidades EBC. Quando classificada de acordo com o teor alcoólico, a cerveja pode ser classificada em: sem álcool, quando seu conteúdo for menor a 0,5 % em volume; com álcool quando seu teor alcoólico for superior a 0,5% (BRASIL, 2009).

A cerveja pode ser classificada também quanto a proporção de malte de cevada, podendo ser cerveja puro malte (possui 100% de malte de cevada em peso, sobre o extrato primitivo), cerveja (proporção de cevada maior ou igual a 50 %) e cerveja com o nome do vegetal predominante (quando possuir proporção maior do que 20 % e menor do que 50 % em peso) (BRASIL, 2009).

A cerveja pode ser classificada ainda de acordo com o seu tipo, poderá ser denominada: Pilsen, Export, Lager, Dortmunder, Munchen, Bock, Malzbier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, Alt e outras denominações internacionalmente reconhecidas que vierem a ser criadas, observadas as características do produto original.

3.1.1 Água

A água é o principal ingrediente na produção de cerveja, representando entre 90 - 95 % do volume final e suas características influenciam diretamente no produto final. Seus íons tem um papel vital na formação do mosto, pois contribuem para a nutrição das leveduras, influenciam nas propriedades tecnológicas das leveduras e tem um impacto no aroma da cerveja, porém em elevadas concentrações podem causar inibição das leveduras ou até mesmo transmitir aromas indesejados para a cerveja (BOULTON; QUAIN, 2008; VENTURINI FILHO, 2010).

Para a produção de cerveja, a água deve ser potável, transparente, inodora, insípida, ter alcalinidade máxima de 50 mg L⁻¹, o pH deve estar entre 4 e 9 e possuir concentrações de cálcio ao redor de 50 mg L⁻¹ (AQUARONE, 2001). O pH alcalino poderá ocasionar a dissolução de compostos do malte e da casca, que são indesejáveis no processamento, ainda neste sentido o pH ácido é favorável para que as enzimas desejáveis durante o processo estejam em atividade máxima. O cálcio e seus sais por sua vez, reduzem a acidez da água, na presença de fosfato diácido de potássio, formando fosfatos monoácidos de cálcio, potássio e gás carbônico, aumentando sua alcalinidade, fator negativo para a produção de cerveja (AQUARONE, 2001).

Quanto a presença de sais, o íon magnésio é um cofator enzimático em muitas reações bioquímicas, principalmente durante a fermentação; os íons de cálcio interagem com os polifosfatos, reduzindo o pH e ativando enzimas como a alfa-amilase e protease, porém em baixas concentrações inibem a extração das resinas do lúpulo e solubilizam compostos adstringentes da casca do malte. Os sais de cloro, em concentrações elevadas (> 600 ppm) inibem a fermentação, por outro lado quando em concentrações abaixo de 400 ppm podem contribuir com sabor salgado. (BOULTON; QUAIN, 2008; TSCERVEJA, 2001; VENTURINI FILHO, 2010).

3.1.2 Malte

O termo malte define a matéria prima que sob condições controladas, resulta da germinação de qualquer cereal, sendo o mais utilizado, o malte de cevada. Além disso, o malte também é utilizado para fornecer a casca que é utilizada como material filtrante na clarificação de mostos (VENTURINI FILHO, 2010).

A importância da utilização da cevada ou de outro grão malteado se dá através da ativação das enzimas α e β -amilases. Essas enzimas serão responsáveis pela degradação do amido que, durante a produção de cerveja, será transformado em açúcares fermentescíveis. Há ainda a ativação de enzimas proteolíticas, que farão a quebra das proteínas presentes no mosto e que serão responsáveis pela consistência da espuma e como nutriente para a levedura durante a fermentação (BELITZ; GROSCH; SCHIEBERLE, 2004; BOULTON; QUAIN, 2008; KUNZE, 2006).

O malte é matéria prima mais importante para a fabricação de cerveja. Pois é principal responsável não só pelo teor alcoólico da cerveja, mas também pela cor, aromas, sabor, entre outros atributos sensoriais (OETTERER, 2006; KUNZE, 2006).

3.1.3 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus L.*), originário de uma planta trepadeira perene com flores verdes e cônicas, é um ingrediente indispensável na produção de cerveja. Ele atua como clarificante, pois precipita as proteínas do mosto; fornece aromas específicos e sabor amargo; na presença de álcool e dióxido de carbono possui propriedades que contribuem para a estabilidade da cerveja, pois a pectina presente no lúpulo melhora a capacidade de formação de espuma na cerveja acabada (AQUARONE, 2001; BELITZ, GROSCH, SCHIEBERLE, 2004; BRUNELLI, 2012).

Os compostos de aroma do lúpulo são provenientes das flores femininas da planta e estão presentes em suas glândulas. Os constituintes do lúpulo são os óleos essenciais (0,2 – 3 %), β -ácidos ou lupulonas (1,5 - 9,5 %), humulonas ou α -ácidos (2,0 - 16,0 %) (SILVA e FARIA, 2008).

Os β -ácidos contribuem em menor intensidade no amargor (TECHAKRIENGKRAIL, 2004). Eles possuem ação bactericida, agindo no transporte de metabólitos na membrana celular e alterando o pH intracelular (SIMPSON; SMITH, 1992).

Os α -ácidos são isomerizados através de calor produzindo os iso- α -ácidos, que são constituídos principalmente por isohumulona, isocohumulona e isoadhumulona. Em vários trabalhos, os iso- α -ácidos têm sido relacionados com a intensidade do amargor em cervejas (SILVA e FARIA, 2008). Estes são considerados mais amargos que os ácidos originais não isomerizados, sendo responsáveis por mais de 70% do amargor detectado sensorialmente em cerveja (TECHAKRIENGKRAIL et al., 2004).

O lúpulo pode ainda ser substituído total ou parcialmente por seus extratos ou por outros princípios amargos (BRASIL, 2009).

3.1.4 Levedura

A levedura cervejeira não pode ser considerada uma matéria-prima na produção de cerveja, pois é utilizada apenas como agente de fermentação bioquímica através da fermentação alcoólica. As características de sabor e aroma das cervejas são determinadas principalmente pelo tipo de levedura empregada na produção, pois além do etanol, principal produto gerado, produzem ácidos orgânicos, ésteres, álcoois superiores, aldeídos, entre outros compostos que fornecerão aromas distintos para a cerveja (AQUARONE, 2001; HEGGART, 2000 VENTURINI FILHO, 2010).

No processo de fabricação de cerveja, o tipo de levedura utilizada e a forma como é conduzida a fermentação, gera dois tipos de cerveja: tipo *Ale* e tipo *Lager*. A cerveja *Lager* é produzida por leveduras de baixa fermentação, (7 a 15 °C), as quais floculam no final da fermentação, sendo coletada na base do fermentador. Já nas cervejas do tipo *Ale*, são usadas leveduras de alta fermentação, com temperaturas entre 18 e 22 °C (AQUARONE, 2001; VENTURINI FILHO, 2010; OETTERER, 2006).

3.2 CACAU

O termo cacau refere-se tanto ao fruto quanto a semente da planta da espécie *Theobroma cacao L.*, pertencente à Família *Sterculiaceae* (WOOD e LASS, 1985). Originária na América do Sul, a oeste dos Andes, o cacaueiro é uma árvore tropical e de clima úmido. Existem basicamente três variedades de cacau: 'Forastero' (Figura 1A), 'Criollo' (Figura 1B) e 'Trinitário' (Figura 1C) (ICCO, 2007).

O cacau Criollo, o qual é classificado como mais suave, já que as antocianinas responsáveis pelo sabor 'forte' e adstringente estão ausentes, possui cotilédones brancos sendo considerado de qualidade superior por requerer em sua pós-colheita uma fermentação mais curta (2 dias) o que o torna mais aromático.

A variedade Forastero possui cotilédones de cor púrpura, devido à presença de antocianinas e é a variedade mais abundante, sua pós-colheita exige fermentação por cerca de 120 horas, tornando-o menos aromático. A terceira variedade, 'Trinitário', é um híbrido entre o 'Forastero' e o 'Criollo', gerando produtos de melhor qualidade que

os 'Forasteros', seus cotilédones possuem coloração que varia de branco até púrpura (COPETTI, 2009; BECKET, 2009; MEDEIROS e LANNES, 2010).

Figura 1 – Variedades de Cacau



1A: cacau forasteiro; 1B: cacau criollo; 1C: cacau trinitário.
(Fonte: UQ, 2017).

3.2.1 Beneficiamento

Antes do cacau ser transformado em chocolate e derivados de cacau é necessário que seja realizado um processamento, pois suas sementes *in natura* apresentam elevada adstringência (COPETTI, 2009). O sabor característico de chocolate é obtido exclusivamente de sementes fermentadas, secas e torradas de cacau (CRUZ, 2012).

Após a colheita faz-se a quebra dos frutos de cacau e a retirada da polpa que está aderida na semente, para que dentro de 24 horas possa ser iniciada a fermentação (EFRAIM, 2004).

Posterior à quebra, ocorre a fermentação de forma espontânea, a partir de leveduras presentes no ambiente que cerca o processo de produção, desde a quebra dos frutos até a secagem (ar, árvores, dentre outros), nas mãos dos manipuladores, nos equipamentos e, principalmente, dos insetos que circulam ao redor da massa de cacau, como a mosca (gênero - *Forcypomia*) polinizadora dos cacauzeiros. A fermentação é dividida em duas fases: alcoólica e acética, anaeróbia e aeróbia, respectivamente. A fase alcoólica ocorre nos dois primeiros dias de fermentação, dentro da massa de cacau. Com a ação das leveduras, os açúcares da polpa são transformados em álcool e gás carbônico, liberando calor desta reação que resulta no aumento da temperatura da massa de cacau entre 30 a 32 °C. Algumas leveduras são capazes de romper a pectina presente na parede celular da polpa, gerando um suco

escuro chamado de “mel de cacau”, que ao escoar facilita a entrada de ar na massa de cacau, elevando os níveis de oxigênio e estimulando o início da segunda fase de fermentação (FERREIRA, 2013).

Com o aumento dos níveis de oxigênio, acrescido pelo revolvimento da massa de cacau e com a elevação da temperatura, as condições tornam-se ideais para o desenvolvimento de bactérias acéticas. Estas farão o processo de fermentação acética via DH, resultando na elevação da temperatura do meio até aproximadamente 50 °C. O ácido acético penetra na semente e, quando combinada com o calor, elimina a capacidade germinativa do embrião, transformando a semente em amêndoa e também induzindo reações bioquímicas que geram os precursores químicos do sabor e cor de chocolate (COPETTI, 2009; FERREIRA, 2013).

Imediatamente após a fermentação, inicia-se a etapa de secagem das amêndoas, para que a umidade seja reduzida e que ocorram reações enzimáticas responsáveis pelo sabor característico de chocolate. Posterior a secagem, as amêndoas de cacau são torradas, etapa fundamental Na obtenção das características de qualidade do chocolate finalizado (EFRAIM, 2004; FERREIRA, 2013). Após estas etapas serem finalizadas, o cacau está pronto para ser processado e tornar-se chocolate.

3.2.2 Composição bromatológica e a influência do cacau sobre as características tecnológicas

A composição química das amêndoas de cacau depende de diversos fatores, mas principalmente da espécie e origem das amêndoas, das práticas agrícolas e do grau de maturação dos frutos e do processo de produção. No geral, a amêndoa seca e torrada de cacau apresentou teores semelhantes aos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição centesimal das amêndoas seca e torrada de cacau em base seca (g/100g)

Constituinte	Amêndoa seca	Amêndoa torrada
Gordura	53,54	54,38
Proteínas	14,70	15,00
Cinzas	2,81	2,85
Fibras	5,55	5,94
Carboidratos	23,40	21,83

Fonte: Drummond, 1998

O componente majoritário do cacau é a gordura, totalizando cerca de 50 % do seu conteúdo total. Por conter elevado teor de lipídios, a matriz, o cacau, é altamente susceptível a oxidação lipídica. Esta reação é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, ocasionando alimentos impróprios ao consumo, além de provocar outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional (CRUZ, 2012; SOARES, 2012).

Os lipídios são constituídos por uma mistura de monoacilgliceróis a triacilgliceróis, ácidos graxos livres, glicolipídios, fosfolipídios, esteróis e outras substâncias. Estes constituintes, em sua grande maioria são oxidáveis em diferentes graus, sendo que os ácidos graxos insaturados são as estruturas mais susceptíveis ao processo oxidativo. Os processos oxidativos abrangem a oxidação enzimática, a foto-oxidação e a auto-oxidação. A auto-oxidação é o principal mecanismo de oxidação de lipídios em alimentos, e ocorre, em três etapas, são elas a iniciação, propagação e terminação, que levam à formação de radicais livres (RAMALHO e JORGE, 2006).

A auto-oxidação dos lipídios pode ocorrer devido a presença de oxigênio e exposição ao calor, inclusive à temperatura ambiente, como o encontrado por Quast e Aquino (2004), que a 25 °C também ocorreu oxidação dos lipídios, tanto quanto a 38 °C em amostras de café arábica e robusta, contendo 14 e 9 % de gordura, respectivamente (SOARES, 2012).

A concentração elevada de gordura no cacau, pode trazer problemas tecnológicos para a produção de cerveja, pois, durante este processo, no resfriamento do mosto cervejeiro, ocorre a aeração, para estimular o crescimento das leveduras principalmente no início do processo fermentativo (OETTERER, 2006). Caso a fermentação de cerveja seja conduzida sob temperatura de 22 °C, a auto-oxidação dos lipídios presentes no cacau pode ser favorecida. No entanto não foram encontrados estudos sobre a oxidação em cervejas.

3.2.3 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são abundantes vegetais e alimentos derivados de vegetais, são originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução, além disso se formam em condições de

estresse como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK, SHAHIDI, 2004). No corpo humano atuam sequestrando radicais livres, associados à redução no risco de doenças cardiovasculares, câncer e outras doenças crônicas. (MOREIRA, MANCINI FILHO, 2004; SPENCER, 2008).

Os polifenóis do cacau têm sido relacionados de forma positiva a saúde cardiovascular através da inibição da peroxidação de lípidos, a ativação de plaquetas ou a atividade da ciclo-oxigenase e lipoxigenase, além de aumentarem os níveis de óxido nítrico, um dos fatores responsáveis pelo relaxamento derivado do endotélio (LECUMBERRI, 2007). Outro estudo demonstrou diminuição nos níveis de 8-hidroxi-desoxiguanosina, que é um dos biomarcadores de danos oxidativos, em ratos após o consumo de cacau (OROZCO, WANG e KEEN, 2003).

No cacau, os compostos fenólicos são encontrados no cotilédone da semente. A quantidade total de fenólicos solúveis presentes em farinhas desengorduradas da semente fresca de cacau representa cerca de 15 a 20 % do seu conteúdo. Por outro lado, em sementes fermentadas esse valor cai para 5 % (BRITO, 2000, apud EFRAIM, 2004). Esse fato pode ser explicado por SHAHIDI e NACZK (2003) que afirmaram que a etapa de fermentação envolve algumas mudanças no conteúdo fenólico do cacau, ocorrendo uma forte diminuição do teor de fenólicos totais solúveis e a polimerização de compostos, sobretudo de epicatequinas entre si ou com antocianidinas, para formar taninos de alto peso molecular.

As sementes não fermentadas de cacau possuem de 6 a 8 % de seu peso seco de compostos fenólicos. Os principais compostos fenólicos encontrados no cacau, são da classe dos taninos e dos flavonoides. Entre os flavonoides mais abundantes, os flavanóis, cerca de 60 %, e possui como principais analitos a catequina e a epicatequina (EFRAIM, ALVES E JARDIM, 2011). A epicatequina é o principal composto fenólico do cacau (aproximadamente 35 % do teor de polifenóis do cacau 'Forasteiro' não fermentados). Compostos fenólicos solúveis de amêndoas de cacau de cacau fermentados e secos variam de 2 a 6 %, dependendo da variedade e da origem geográfica. O conteúdo de fenólicos solúveis do 'Criollo' é cerca de 2/3 do conteúdo fenólico do 'Forasteiro' que contém cerca de 6 % (ARLORIO, 2005).

3.2.4 Metilxantinas

Embora a grande maioria dos estudos demonstre que os benefícios do cacau para a saúde sejam atribuídos aos compostos fenólicos, deve-se notar que estes não são apenas ricos nestes compostos. O cacau possui mais de 500 compostos, entre eles as metilxantinas, são os mais destacados. Das metilxantinas encontradas no cacau, está a teobromina, em maior concentração, seguida pela cafeína e por último a teofilina. A cafeína está presente no cacau em cerca de um oitavo da concentração da teobromina, enquanto que a teofilina se encontra em nível traço (MADEIROS e LANNES, 2009; BIZZOTO, 2010).

As metilxantinas são alcaloides derivados da purina naturalmente presentes no cacau, biologicamente ativos, que estão presentes naturalmente em muitos alimentos e bebidas. Os principais representantes desta classe de compostos são a cafeína, teobromina e teofilina. Cada um destes compostos é provável que tenha efeitos fisiológicos semelhantes no corpo, incluindo a estimulação do sistema nervoso central, do músculo cardíaco e do musculoesquelético, podendo também ter efeitos diuréticos. Também são associados a efeitos nos sistemas gastrointestinal, respiratório e renal (LI et al, 2012). A cafeína é um conhecido estimulante do sistema nervoso central mas a teobromina é muito mais fraca, tendo cerca de um décimo do efeito da cafeína (BIZZOTO, 2010; FERREIRA, 2013).

Smit (2004) que em dois ensaios humano duplo-cego, controlados com placebo, mediram os efeitos do cacau em pó e as metilxantinas encontrados em 50 g de chocolate escuro sobre desempenho cognitivo e o humor, mostraram que as ocorrem mudanças no humor e no comportamento, incluindo o sentimento mais energético, a motivação aumentada ao trabalho e maior agilidade. Em outro estudo Neufingerl et al (2013) com bebidas lácteas, a base de cacau, comprovaram que teobromina aumentou de forma independente as concentrações séricas de colesterol HDL em $0,16 \text{ mmol L}^{-1}$ e que a teobromina pode ser o principal ingrediente responsável por este aumento. Há estudos ainda que apontam que as metilxantinas apresentam relação com a saúde dos dentes; no tratamento da apnéia ocasionada em bebês prematuros; reduz a incidência de doenças degenerativas, tais como Parkinson e mal de Alzheimer; e diversos outros efeitos benéficos à saúde (ARANDA, 2010; COSTA, 2010; ESKELINEN 2009; KARGUL, 2012; MAIA, MENDONCA, 2002).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRA

Para a produção das cervejas foram utilizados, maltes *chateau pale ale*, malte *wheat blanc*, malte *chateau wheat crystal*, nas proporções de 50, 35 e 15 %, respectivamente. Os lúpulos de amargor e aroma utilizados, em forma de *pallets*, foram do tipo *Halertau perle* e *Sazz*, respectivamente, procedentes da Alemanha. A levedura cervejeira utilizada, foi Fermentis wb-06, cepa de *Sacharomyces cerevisiae*. Toda matéria prima cervejeira foi obtida da empresa WE consultoria. Para o desenvolvimento das cervejas foi utilizado água mineral, da marca Água da Pedra®, sem correção do pH (pH 7,2).

O cacau utilizado foi da variedade Trinitário de cacauzeiros oriundos do sul da Bahia, do município Buerarema, doados pela fazenda Iguatemi.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em três etapas:

Ensaio 1 - Bromatológico: análise composição química das amêndoas seca e torrada de cacau. Em cada tratamento foram aplicadas 3 repetições totalizando 6 unidades amostrais. Para avaliar as perdas nutricionais do processo de torrefação.

Ensaio 2 - Extratibilidade: determinação da capacidade de extração fenólica do cacau. Foram elaborados 6 tratamentos em esquema bifatorial (2 x 3) (Amêndoa seca e torrada) versus extratos hidroalcoólicos (0 %, 4 % e 70 %). Em cada tratamento foram aplicadas 3 repetições totalizando 18 unidades amostrais. Para avaliar o potencial de contribuição de compostos bioativos.

Ensaio 3 – Experimental: foram elaboradas 5 formulações de cerveja com adição de cacau, na concentração de 0 % ou 2 % conforme Tabela 2 em determinadas etapas do processo de produção das cervejas. Em cada tratamento foram aplicadas 4 repetições totalizando 20 unidades amostrais. Para avaliar a melhor etapa de adição da amêndoa torrada de cacau.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos utilizados na elaboração das cervejas de cacau

Tratamento / etapa	Condições de adição de cacau	Concentração de Cacau
Controle	Sem adição	0 %
Brassagem	Adição durante 160 min de 45 à 75 °C	2 %
Lupulagem	Adição de 1 % no início da fervura e 1 % aos 30 min até 60 min à 100 °C (Substituição total do lúpulo de amargor)	2 %
Fermentação	Adição durante 07 dias à 24 °C	2 %
Maturação	Adição durante 21 dias à 4 °C	2 %

4.3 TORREFAÇÃO DO CACAU

Para a utilização do cacau nas cervejas, o mesmo foi torrado segundo metodologia utilizada por Fadini (1998), com adaptações, em forno com circulação de ar, a 150°C por 42 minutos, para que obtivesse as características do cacau empregado na produção de chocolate. Para a caracterização e elaboração dos extratos, as amostras de cacau foram trituradas em micro moinho Marconi® MA-630 seguido de tamisação (partículas <1 mm) (Figura 2A). Para o uso na elaboração das cervejas, a amêndoa torrada de cacau foi reduzido a *nibs* (partículas 5 - 10 mm) (Figura 2B). Todas as determinações analíticas foram efetuadas em triplicatas.

Figura 2 – Amêndoa torrada de cacau



2A: Pó de cacau; 2B: Nibs de cacau.

4.4 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO CACAU

A atividade de água foi medida diretamente, por meio de um analisador de atividade de água da marca AquaLab®, modelo 4TEV, à temperatura constante (25°C), conforme recomendações do fabricante. A umidade da amostra foi realizada em estufa a 105 °C até peso constante, o material mineral por meio da incineração em mufla a 550 °C por 5 h (AOAC, 2005). A gordura foi quantificada gravimetricamente após extração à frio com clorofórmio e metanol (BLIGH e DYER, 1959). O teor de fibra bruta foi determinado por digestão ácida e alcalina, corrigido para matéria mineral. A proteína bruta foi realizada através da determinação de nitrogênio pelo método de Kjeldahl. Os carboidratos foram calculados a partir da diferença entre a massa inicial da amostra (100 g) e os valores obtidos para umidade, proteínas, lipídios, fibra bruta e cinzas. O valor energético total foi calculado aplicando-se os valores de conversão para carboidrato e proteína (4 kcal g⁻¹) e lipídio (9 kcal g⁻¹) (BRASIL, 2003). Os resultados da composição química foram expressos em base úmida.

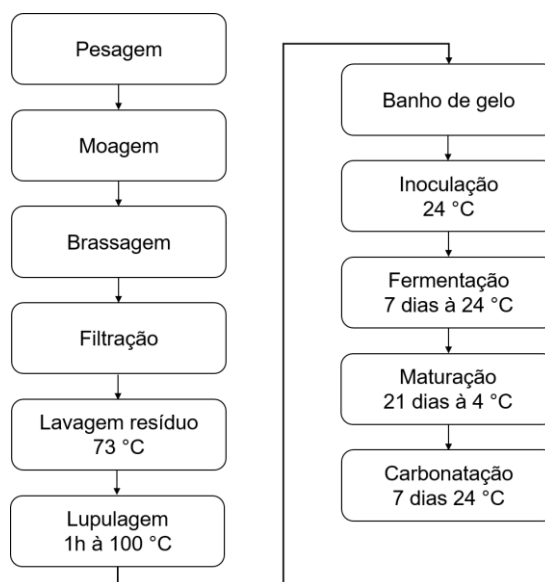
4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE CACAU

As amostras de cacau foram previamente desengorduradas segundo IAL (2005), utilizando éter de petróleo. Os extratos foram elaborados segundo EFRAIM (2006), onde 0,4 g de amostra (pó de amêndoa seca ou torrada) e 20 mL do extrato hidroalcoólico (0, 4 e 70%) foram adicionados em tubos Falcon. Os tubos foram agitados por 20 minutos em mesa agitadora, centrifugados à 3700 rpm durante 10 minutos e os sobrenadantes foram reservados em frascos âmbar até o momento das análises físico-químicas.

4.6 PRODUÇÃO DAS CERVEJAS

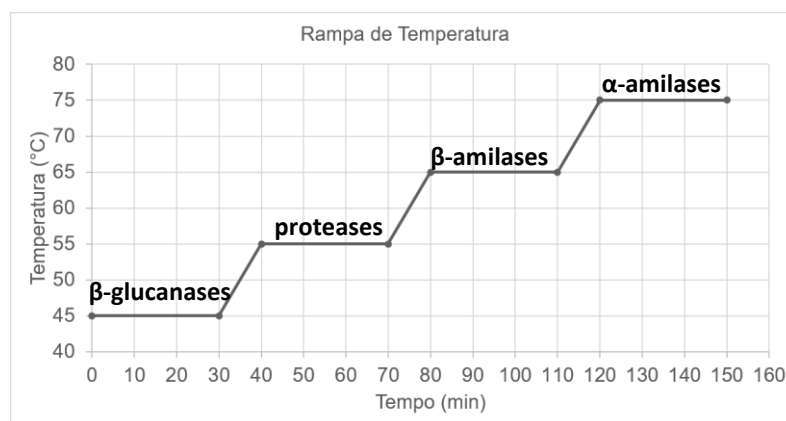
A produção das cervejas foi realizada conforme Venturini Filho (2010), com adaptações. Os procedimentos da produção estão descritos na Figura 3. O malte foi moído em moinho de dois rolos (1 mm de distância) e adicionado em mosturador contendo água a 45 °C, dando início a brassagem.

Figura 3 - Fluxograma de produção de cerveja



No processo de brassagem há um aumento sucessivos de temperaturas (Figura 4), quando o mosto atingiu as temperaturas 45°C, 55°C, 65°C ou 73°C, manteve-se a temperatura em um intervalo de 30 minutos, para que ocorresse o tratamento enzimático. Os SST e o pH foram mensurados no início e no final de cada intervalo. Para verificar a sacarificação total do amido foi realizado, ao final da mosturação, o teste do iodo (0,02 N), pela ausência da coloração roxo-azulado, caracterizada pela reação do iodo com o amido.

Figura 4 – Relação tempo e temperatura empregada na brassagem para a produção das cervejas.



Posterior a brassagem, foi realizado a filtração do mosto cervejeiro, em peneira (1,5 mm), o resíduo foi lavado com água mineral à 73 °C, para aproveitamento de todos os carboidratos, após a lavagem o resíduo foi descartado.

O mosto retornou para o mosturador para dar-se início a etapa onde o lúpulo é adicionado, chamada fervura ou lupulagem, que teve duração de 1 hora. O lúpulo de amargor, ou a amêndoa de cacau torrada (tratamento lupulagem), foi adicionado no início da fervura e depois de decorrido 30 minutos; o lúpulo aromático foi adicionado nos últimos 10 minutos de fervura.

Após a lupulagem, o mosto cervejeiro foi resfriado rapidamente à 24 °C, temperatura ideal para inoculação da levedura e evitando assim a contaminação bacteriana. A levedura, previamente ativada com água mineral a 24 °C, foi então inoculada para que iniciasse a fermentação, a qual durou 7 dias.

Ao final da fermentação, as cervejas foram maturadas por 21 dias à 4 °C (TABELA 2). Posteriormente a maturação, as cervejas foram trasfegadas e fez-se a realização do *primming*, com concentração de 11 g L⁻¹ de açúcar cristal, em garrafas de 2 L, mantidas a 24 °C para que ocorresse a segunda fermentação, denominada carbonatação.

Posterior a carbonatação, foram realizadas as análises físico-químicas e sensoriais das cervejas.

4.7 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DOS EXTRATOS DE CACAU E DAS CERVEJAS

4.7.1 Compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos totais das cervejas e dos extratos de cacau foram determinados pela reação de oxirredução do reagente de Folin-Ciocalteu, o qual reage com as hidroxilas presentes nos polifenóis. As leituras em triplicada da absorbância foram realizadas em espectrofotômetro UV-visível (FEMTO® 600 plus) em comprimento de onda de 765 nm, após duas horas ao abrigo da luz, conforme metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965). Utilizou-se como padrão o ácido gálico (0 a 80 mg L⁻¹) para construir a curva de calibração. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de equivalente de ácido gálico por litro de cerveja (mg EAG L⁻¹) ou gramas de cacau (mg EAG g⁻¹).

4.7.2 Flavonóides

O teor de flavonóides totais foram analisados pelo método colorimétrico segundo Zhinshen, Mengcheng e Jianming (1999). As leituras foram realizadas em triplicata das absorbâncias em espectrofotômetro UV-visível (FEMTO® 600 plus), em comprimento de onda de 510 nm. O teor de flavonóides foi determinado utilizando-se uma curva padrão de catequina (0 a 200 mg L⁻¹) e os resultados foram expressos em mg equivalente de catequina por litro de cerveja (mg CAT L⁻¹) e gramas de cacau (mg CAT g⁻¹).

4.7.3 Método radical DHHP (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

A metodologia utilizada foi descrita por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) com algumas adaptações. O método tem por base a redução do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) por antioxidantes da amostra produzindo um decréscimo da absorbância a 517 nm que podem ser detectados por espectrofotometria.

A solução estoque de DPPH• foi preparada dissolvendo-se 24 mg de DPPH• em 100 mL de etanol, mantida sob refrigeração e protegida da luz até o momento das determinações. A solução de trabalho será obtida por diluição da solução de DPPH• com etanol obtendo-se uma absorbância de cerca de 1,100 ($\pm 0,02$) a 517 nm, usando espectrofotômetro UV-visível (FEMTO® 600 plus).

As absorbâncias foram efetuadas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm contra um branco controle. A concentração de DPPH foi calculada utilizando o Trolox como padrão (0 a 0,250 mM). Os resultados foram expressos em mM de TEAC por grama (mM TEAC g⁻¹) para o cacau e para as cervejas em litros (mM TEAC L⁻¹) (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.7.4 Método radical ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método do radical ABTS, foi utilizada metodologia de Re et al., (1999), o qual baseia-se na geração do ABTS que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com o persulfato de potássil, sendo que com a adição de um antioxidante ocorre a redução do radical

ABTS^{o+} a ABTS, promovendo a perda da coloração do meio reacional. A absorbância foi monitorada em espectrofotômetro UV-visível a 750 nm, após 6 minutos de reação.

O antioxidante sintético Trolox (1mM) foi utilizado nas concentrações de 0 a 0,200 mM em etanol, para a construção de uma curva de calibração. Os resultados foram expressos em mM de TEAC por grama (mM TEAC g⁻¹) para o cacau e para as cervejas em litros (mM TEAC L⁻¹) (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox).

4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS CERVEJAS

4.8.1 Determinação de cor (EBC)

A determinação de cor foi baseada na Convenção Europeia de Cerveja (European Brewery Convention) (SEATON; CANTRELL, 1993), realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 430 nm.

4.8.2 Determinação de unidades de amargor (BU)

A análise global de amargor, normalmente expressa como Bitterness Units, foi determinada após extração por isooctano (2,2,4-trimetilpentano) em amostras de cervejas acidificadas com HCl 6N, seguido de medição espectrofotométrica em comprimento de onda de 275 nm, utilizando-se metodologia descrita por Philpott, Taylor e Williams (1997).

4.8.3 Determinação do teor de extrato real e primitivo

A determinação do extrato real (ER) foi baseada na pesagem do resíduo seco de um certo volume de amostra submetido a evaporação (IAL, 2008), em uma cápsula previamente dessecada.

O extrato primitivo (EP) será obtido por meio de cálculo envolvendo os valores de teor alcoólico e extrato real segundo a formula de Balling (IAL, 2008).

4.8.4 Determinação do teor alcoólico

O teor alcoólico das amostras foi determinado por meio de alcoômetro, conforme instruções do fabricante, previamente calibrado, pelo princípio de

aerometria, à temperatura ambiente de referência (15 °C), sendo o resultado expresso em °GL.

4.8.5 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada através de método potenciométrico em medidor de pH (DM 22 Digimed®), previamente calibrado com soluções tampões (Merck®) pH 4,0 e 7,0, a temperatura constante de 20 °C (AOAC, 2005).

4.8.6 Determinação dos sólidos solúveis totais (SST)

Os sólidos solúveis totais (SST) foram determinados através de leitura direta em refratômetro portátil (Biobrix-Refractometro, 103), em sala climatizada a 20 °C e os valores expressos em °Brix (AOAC, 2005).

4.9 AVALIAÇÃO SENSORIAL

As formulações das cervejas com adição de cacau foram avaliadas sensorialmente por meio de testes afetivos de ordenação quanto à preferência e o teste de aceitabilidade. A avaliação sensorial foi realizada em sala com cabines individuais, com ausência de odores e sob luz branca, nas dependências do laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

As amostras foram servidas em temperatura adequada para cerveja (5 °C) em copos de acrílico de 50 mL, transparentes e codificados com algarismos de três dígitos aleatórios. Além disso, foram oferecidos a todos provadores um copo com água à temperatura ambiente e um biscoito de água e sal, para proporcionar a limpeza das papilas gustativas entre as avaliações das amostras (FERREIRA et al., 2000). As análises sensoriais foram realizadas por 100 alunos e funcionários recrutados em caráter totalmente voluntário, informados verbalmente no ato do recrutamento e por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O teste afetivo de aceitação foi realizado em uma segunda sessão utilizando escala hedônica estruturada verbal de sete pontos (1 = desgostei muitíssimo, 4 = indiferente e 7 = gostei muitíssimo) para avaliação de sabor, odor, cor, estabilidade da espuma e aparência global. (FERREIRA et al., 2000).

O teste de ordenação, realizado em uma primeira sessão avaliou a preferência global dos provadores em relação às formulações considerando a aparência global dos 5 tratamentos, ordenando assim, as cervejas, do mais preferido ao menos preferido.

Para a realização da análise sensorial, o projeto foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – (CONEP/MS), o qual foi aprovado (CAAE 62207816.7.0000.5346) em seus aspectos éticos e metodológicos atendendo ao que estabelece a Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde (BRASIL, 2012).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos para os extratos e as cervejas foram apresentados como média e foram submetidos à análise de variância (ANOVA) análise de variância multivariada (MANOVA) e teste tukey ($p \leq 0,05$), através do programa Statistica versão 7.0 (StatSoft Inc., 1984 – 2004, Tulsa, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração de cacau (2 %), foram definidos os testes preliminares (dados não apresentados). Durante a fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, concentrações a cima de 2% apresentaram aroma de rancificação, o que possivelmente foi ocasionado pelo elevado teor de gordura das amêndoas torradas de cacau (Tabela 3).

A composição química das amostras de cacau, amêndoa seca e torrada, encontram-se na Tabela 3. O grau de torrefação diminui o teor de água nos alimentos, portanto quando submetido ao calor, ocorreu, na amêndoa torrada, a concentração dos demais compostos do cacau causando pouca perda nutritiva. As proteínas e os carboidratos tiveram uma redução durante a torrefação, pois, provavelmente, ao aquecer o cacau, favoreceu a reação de Maillard, a qual utiliza carboidratos e aminoácidos na produção de compostos de coloração marrom, chamadas melanoidinas (BELITZ, 2004; MISNAWI, JAMILAH, 2004). Redgwell et al (2003) provaram que, durante a torrefação do cacau, ocorre diminuição no teor de carboidratos, decorrente da reação de Maillard. Além disso, a torrefação também é capaz de promover interação entre polissacarídeos, proteínas, polifenóis e produtos de Maillard.

Tabela 3 – Composição nutricional de amêndoa seca e torrada de cacau base seca

	Amêndoa seca	Amêndoa torrada
Atividade de água	0,48 a	0,52 a
pH	5,10 a	5,26 a
Umidade (g 100 g ⁻¹)	3,99 a	2,75 b
Cinzas (g 100 g ⁻¹)	2,79 a	2,92 a
Gordura (g 100 g ⁻¹)	42,92 a	45,08 a
Fibra bruta (g 100 g ⁻¹)	7,50 b	11,75 a
Proteínas (g 100 g ⁻¹)	14,59 a	14,27 a
Carboidratos (g 100 g ⁻¹)	29,32 a	22,12 b
Valor nutricional (Kcal g ⁻¹)	533,54 a	541,23 a

Letras minúsculas diferentes nas linhas corresponde a diferenças significativas entre os tratamentos.

A extração dos compostos bioativos do cacau mostrou-se mais efetiva quando utilizado solução hidro alcoólica a 70 %, pois teve os maiores valores de polifenóis, flavonoides e capacidade antioxidante, para a amêndoa e líquido de cacau (tabela 4). O líquido de cacau, com os extratos 0 e 4 %, tiveram menor teor de flavonoides,

demonstrando que durante a torrefação há uma degradação, de 33,58 e 23,96% respectivamente, destes compostos, porém apresentaram maior teor de polifenóis e capacidade antioxidante, demonstrando que possivelmente a extratibilidade dos compostos fenólicos é mais eficiente em solução contendo etanol do que apenas com água.

A partir dos resultados obtidos (tabela 4), confirma-se que submeter o cacau a elevadas temperaturas (150 °C), na torrefação do cacau, para todos os extratos, diminui significativamente a concentração dos flavonoides, porém não reduziu significativamente os compostos fenólicos. Misnawi e Jamilah (2002), verificaram diminuição de 3 % no teor de polifenóis totais ocasionada pela torrefação de cacau a 120 °C por 45 min, a partir disto foi sugerido que os polifenóis possam se ligar aos compostos formados pela reação de Maillard, as pirazinas.

Em relação a atividade antioxidante, o método do radical DPPH não apresentou diferença significativa, porém o método do radical ABTS (tabela 4), teve maior atividade antioxidante no extrato com amêndoa em 70% de solução hidroalcoólica, esse valor pode ser explicado pelo conteúdo de compostos fenólicos desse extrato. Os extratos que obtiveram maior teor de compostos fenólicos conseqüentemente tiveram maior capacidade antioxidante, pois os polifenóis são ricos em hidroxilas que possui a capacidade de doar moléculas de hidrogênio que auxiliam na estabilização de radicais livres (BURNS et al, 2000).

Tabela 4 - análise dos teores de flavonoides, polifenóis e capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos com 2 % de cacau.

Amêndoa	Flavonóides (mg CAT g ⁻¹)	Polifenóis (mg EAG g ⁻¹)	DPPH (mM TEAC g ⁻¹)	ABTS (mM TEAC g ⁻¹)
Seca 0%	14,91 c	30,89 c	0,01 a	1,19 c
Seca 4%	18,08 c	38,87 b	0,01 a	1,24 c
Seca 70%	38,06 a	71,99 a	0,01 a	2,02 a
Torrada 0%	22,45 b	42,30 b	0,01 a	1,63 b
Torrada 4%	23,78 b	45,40 b	0,01 a	1,71 ab
Torrada 70%	30,54 b	58,18 a	0,01 a	1,82 ab

Letras minúsculas diferentes na coluna corresponde a diferenças significativas entre os tratamentos.

Em relação ao teor alcoólico (tabela 5), as cervejas produzidas neste estudo são classificadas como cerveja com álcool (BRASIL, 2009).

Todos os tratamentos, com exceção do controle, são classificados, pela legislação Brasileira, como cerveja escuro, pois apresentam valor de EBC superior a 20 (BRASIL, 2009; CARVALHO, 2007). Quando verificada a coloração das cervejas, percebe-se que a inserção do cacau na maturação, fez com que os compostos de cor fossem extraídos com mais eficiência, provavelmente devido ao maior tempo de contato (21 dias) e o elevado teor alcoólico (tabela 5). A substituição do lúpulo de amargor pelo líquido de cacau, fez com que a fervura extraísse, também, os compostos de cor presentes do cacau.

O tratamento onde ocorreu a adição do cacau na brassagem apresentou maior teor tanto de extrato real quanto primitivo, conforme pode ser observado na tabela 5. Isso pode ser explicado pelos processos químicos que aconteceram durante essa etapa, que envolvem ação das enzimas proteolíticas e aminolíticas presentes no endosperma do malte, os quais solubilizaram com maior eficiência os compostos sólidos do cacau (BOULTON, QUAIN, 2008). Por apresentarem valores entre 5 e 6 % de extrato primitivo, todos os tratamentos são classificados como cerveja leve.

Tabela 5 – caracterização física das cervejas com adição de 2 % de cacau

Tratamento	Alcool (°GL)		Cor (EBC)		Amargor (BU)	Extrato real (% m/v)		Extrato primitivo (% m/m)		
Controle	6,56	b	15,74	e	14,88	c	4,02	d	5,31	d
Brassagem	6,89	ab	31,18	bc	32,57	a	4,60	a	6,06	a
Lupulagem	7,33	a	32,92	b	5,20	d	4,34	b	5,69	b
Fermentação	6,79	ab	29,98	cd	22,40	b	4,21	c	5,55	c
Maturação	7,07	a	40,23	a	11,53	c	4,39	b	5,77	b

Letras minúsculas diferentes na coluna corresponde a diferenças significativas entre os tratamentos.

As cervejas com adição de cacau apresentaram valores de flavonoides 3 vezes maiores que o tratamento Controle, exceto quando inserido na Brassagem onde o teor foi 2 vezes superior (Tabela 6). Esse apresentou tal comportamento pois foi o tratamento onde os compostos permaneceram maior tempo sob aquecimento, sugerindo degradação ou complexação entre compostos fenólicos ou outros compostos. O resultado mais significativo foi quando inserido na Fermentação onde obteve-se 731,72 mg EAG L⁻¹ de cerveja, este valor superior pode ter sido ocasionado

pelo amêndoa torrada ter sido adicionado durante o processo de obtenção de álcool, tornando mais intensa a extração destes compostos. Esse fato possivelmente ocorreu pelo aumento progressivo do teor alcoólico, temperatura superior (22 °C) em relação à maturação (4 °C), além da ação das leveduras.

Quando observado os resultados da capacidade antioxidante das cervejas percebe-se que há diferença entre as técnicas. Porém, ambos métodos apontaram o tratamento fermentação como o com maior atividade antioxidante, o que pode ser explicado por este tratamento ser o que contém maior concentração de compostos fenólicos. Este fato é confirmado por SOARES (2002), que afirmou que a presença do anel benzênico e um ou mais grupamentos hidroxila e/ou metoxila confere propriedades antioxidantes aos fenólicos. Apesar do mecanismo de reação entre os métodos ABTS e DPPH serem baseados na interação com os prótons liberados dos fenólicos, aparentemente, há uma grande diferença entre os métodos, possivelmente pela força de reação dos agentes oxidantes (KARADAG, 2009; THAIPONG, 2006).

Tabela 6 - Análise dos teores de flavonoides, polifenóis e capacidade antioxidante de cervejas com adição de 2 % de cacau

Tratamento	Flavonóides (mg CAT L ⁻¹)	Polifenóis (mg EAG L ⁻¹)	DPPH (mM TEAC ⁻¹)	ABTS (mM TEAC ⁻¹)
Controle	43,70 c	476,98 c	0,01 d	0,74 b
Brassagem	86,36 b	642,93 b	0,06 c	0,98 ab
Lupulagem	126,98 a	674,83 b	0,11 ab	0,93 ab
Fermentação	138,64 a	731,72 a	0,12 a	1,29 a
Maturação	133,26 a	659,00 b	0,11 b	1,16 a

Letras minúsculas diferentes na coluna corresponde a diferenças significativas entre os tratamentos.

Os tratamentos denominados Lupulagem, Fermentação e Maturação foram os preferidos pelos provadores. Porém quando realizado o teste de aceitação, os atributos com maior nota foram atribuídos à Lupulagem (Tabela 7).

O tratamento Lupulagem, foi o mais aceito e o mais preferido (Tabela 7), o que pode ser explicado em relação ao sabor, onde este possuiu menor teor de amargor, tornando a substituição um fator tecnologicamente positivo. Esse tratamento possui elevada concentração de flavonoides (126,98 mg L⁻¹) e um elevado teor de polifenóis (674,83 mg L⁻¹) (Tabela 6), tornando-o potencialmente rico em compostos bioativos.

Tabela 7 – Aceitabilidade e preferência das cervejas de cacau à 2 %

Tratamento	Cor		Aroma		Sabor		Espuma		Aparência Global		Preferência	
Controle	5,11	b	5,28	a	4,93	a	5,16	a	5,16	ab	257	b
Brassagem	5,60	a	5,32	a	4,87	a	5,21	a	5,33	a	253	b
Lupulagem	5,65	a	5,15	a	4,55	a	5,16	a	5,16	ab	313	ab
Fermentação	5,52	a	5,13	a	3,83	b	5,22	a	4,78	b	371	a
Maturação	5,49	ab	5,04	a	3,86	b	5,06	a	4,83	b	372	a

Letras minúsculas diferentes na coluna corresponde a diferenças significativas entre os tratamentos.

A substituição de 100 % do lúpulo de amargor no desenvolvimento da cerveja, foi positivo, pois conseguiu equiparar o sabor. Nesse sentido, observa-se que o sabor menos aceito foi nos tratamentos onde o cacau foi adicionado à frio, ou seja, durante a fermentação e maturação (Tabela 7). Ressalte-se que as características predominantes do lúpulo, além do sabor amargo, como a estabilidade microbiológica é mantida, pois ocorreu também a adição do lúpulo aromático, que possui de 3 a 6 % de α -ácidos.

6 CONCLUSÃO

A torrefação causou redução das proteínas e dos carboidratos, que quando submetido à aquecimento devido a reação de Maillard. Durante o processamento de torrefação, ocorreu também a redução dos flavonoides, sem alterar significativamente o teor de polifenóis.

A extratibilidade dos compostos bioativos foi mais eficiente com solução hidroalcoólica de 70% mostrando a alta afinidade com etanol.

A amêndoa torrada de cacau é uma matéria-prima rica em gorduras, limitando a incorporação em 2 % para atender características tecnológicas. Além de ser rico em compostos fenólicos, especialmente flavonoides, dessa forma, torna-se uma boa opção para incorporar compostos bioativos na cerveja.

A etapa de adição da amêndoa torrada de cacau que mais se destacou quanto aos atributos testados, foi a etapa Lupulagem. Essa apresentou elevados valores de compostos fenólicos, valor 3 vezes superior em teor de flavonoides, menor valor de amargor da cerveja, tornando-o aceitável para o público. Demonstrando que a amêndoa torrada de cacau é uma matéria-prima viável para a substituição do lúpulo de amargor.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRABE - Associação Brasileira De Bebidas. **Mercado**. São Paulo, 2015. Disponível em: < <http://abrabe.org.br/>> Acesso em: 10 out. 2015.

AGÊNCIA BRASIL. Setor de microcervejarias cresce no Brasil. Disponível em: <<http://agenciabrasil.ebc.com.br/noticia/2010-06-28/setor-de-microcervejarias-cresce-no-brasil>> Acesso em: 19 out 2015.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of the AOAC International**. 18 th ed., supplement 1998. Washington: AOAC, 1018p. 2005.

AQUARONE, et al. **Biotecnologia Industrial**. Vol 4. São Paulo: Editora Bucher, p. 91-144, 2001.

ARANDA, J. V. et al. Caffeine impact on neonatal morbidities. **Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 23, p, 20–23, 2010.

ARLORIO, et al. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from *Theobroma cacao* hulls extracted with supercritical CO₂. **Food Research International**, v. 38 p. 1009–1014, 2005.

BECKETT, S. T. **Industrial chocolate manufacture and use**. London: Chapman and Hall, 2009. p. 720.

BELITZ, H. -D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food chemistry**. 3 ed. Garching: Springer, p. 892 – 968, 2004.

BIZZOTO, C. S. **Metilxantinas por eletroforese capilar: desenvolvimento, otimização e validação de método. Aplicação em café descafeinado e outras bebidas**. 2010. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2010.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal Biochemistry Physiological**, Ottawa, v. 27, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast and fermentation**. vol.1. EUA: Wiley-Blackwell, p. 19- 60, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidante activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.22, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL (2009). MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO Decreto nº 6.871, de 4 jun. 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. Diário Oficial da União. P. 20. 05 jun. 2009.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres Humanos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 13 jun. 2012.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n. 360, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 dez. 2003.

BRITO, E.S. **Estudo de mudanças estruturais e químicas produzidas durante a fermentação, secagem e torração de amêndoas de cacau (*Theobroma cacao* L.) e propostas de tratamento para o melhoramento de sabor**. 2000. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2000.

BRUNELLI, L. T. **Produção de cerveja com mel: características físico-químicas, energética e sensorial**. 2012. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Botucatu, 2012.

BURNS, L. et al. Relationship among antioxidant activity, vasodilation capacity, and phenolic content of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 220-230, 2000.

CARVALHO, L. G. **Dossiê Técnico - produção de cerveja**. REDETEC Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro. 2007.

CERVBRASIL. 2016. **Informe dezembro 2016**. Associação Brasileira da Indústria Cervejeira. Disponível em: <http://cervbrasil.org.br/arquivos/informes/161212-InformeCervBrasil_Dezembro_WEB.pdf> Acesso em: 31 jan. 2017.

COPETTI, M. V. **Micobiota do cacau: fungos e micotoxinas do cacau ao chocolate**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinárias) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2009.

COSTA, J. et al. Caffeine exposure and the risk of Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 20, p. 221–238, 2010.

CRUZ, J. F. M. **Caracterização das sementes de variedades de cacau *Theobroma cacao* L. resistentes à vassoura de bruxa durante a fermentação e após a secagem**. 2012. Dissertação. (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2012.

DRUMMOND, M. C. M. **Relação entre o grau de torração do cacau (*Theobroma cacao* L), sua qualidade nutricional e atributos sensoriais**. 1998. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 1998.

DUCRET, J. et al. Amber ale beer enriched with goji berries – the effect on bioactive compound content and sensorial properties. **Food chemistry**, v. 226, p. 109-118, 2017.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonoids durante a fermentação de sementes de cacau para produção de chocolate**. 2004. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2004.

EFRAIM, P. et al. Teores de Compostos Fenólicos de Sementes de Cacaueiro de Diferentes Genótipos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 229-236, dez. 2006.

EFRAIM, P.; ALVES, A. B.; JARDIM, D. C. P.; Revisão: Polifenóis em cacau e derivados: teores, fatores de variação e efeitos na saúde. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 14, n. 3, p. 181-201, 2011.

ESKELINEN, M.H.; et al. Midlife coffee and tea drinking and the risk of late-life dementia: A population-based CAIDE study. **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 16, p. 85–91, 2009.

FADINI, A. L. **Comparação da eficiência do processo convencional de torração frente ao processo por microondas**. 1998. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1998.

FERREIRA, A. C. R. et al. **Guia de Beneficiamento de Cacau de Qualidade**. Instituto Cabruca. Ilhéus, Bahia: 2013. 52p.

FERREIRA, A. S. **Validação da Determinação de Teobromina em amostras de cacau e seus derivados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)**. 2013. Dissertação (Tecnologia e Segurança Alimentar) – Universidade Nova de Lisboa. Lisboa, 2013.

FERREIRA, V. L. P. et al. **Análise sensorial: testes discriminativos e afetivos**. Campinas: SBCTA, 2000. 127p. (Manual – Série Qualidade).

GHISELLI, A. et al. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p.76-80, 2000.

HEGGART, H. et al. Measurement of brewing yeast viability and vitality: a review of methods. **Technical Quarterly – Master Brewers Association of America**, vol 37, p. 409–430, 2000.

IAL. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 1. ed. digital. São Paulo, 2008. 1020 p.

IBOPE. Instituto Brasileiro de Opinião Pública. **Estatística Cerveja é a bebida preferida do brasileiro para comemorações**. 2013. Disponível em <<http://www.ibope.com.br>>. Acesso em: 19 out. 2015.

ICCO. 2007. **Annual Report 2006/2007**. Disponível em: <www.icco.org> Acesso em: 14 out. 2015.

KARADAG, A. et al. Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analysis Methods*, v. 2, p. 41–60, 2009.

KARGUL, B.; et al. Evaluation of human enamel surfaces treated with theobromine: A pilot study. **Oral Health & Preventive Dentistry**, vol. 10, p. 275–282, 2012.

KRAFTCHICK, J. F. et al. Understanding beer tourist motivation. **Tourism Management Perspectives**. v. 12, p. 41- 47, 2014.

KUNZE, W. **Tecnología para cerveceros y malteros**. ed. 1. Berlin: VLV Berlin, 2006. 1075 p.

LECUMBERRI, E. et al. Dietary fibre composition, antioxidant capacity and physico-chemical properties of a fibre-rich product from cocoa (*Theobroma cacao* L.). **Food Chemistry**, v. 104, p. 948–954, 2007.

LI, Y. et al. The effect of alkalization on the bioactive and flavor related components in commercial cocoa powder. **Journal of Food Composition and Analysis**. Vol. 25, p. 17–23, 2012.

MADEIROS, M. L.; LANNES, S. C. S. Avaliação química de substitutos de cacau e estudo sensorial de achocolatados formulados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas, v. 29, p. 247-253, 2009.

MAIA, L.; MENDONCA, A. Does caffeine intake protect from Alzheimer's disease? **European Journal of Neurology**, v. 9, p. 377–382, 2002.

MEDEIROS, M. L.; LANNES, S. C. S. Propriedades físicas de substitutos do cacau. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*. Campinas, v. 30(Supl.1), p. 243-253, 2010.

MISNAWI, S. J., JAMILAH, S. N. B. Effect of polyphenol concentration on pyrazine formation during cocoa liquor roasting. **Food Chemistry**, v. 85, p. 73–80, 2004.

MISNAWI, S. J., JAMILAH, S. N. B. Effects of cocoa liquor roasting on polyphenols content, their hydrophobicity and relation to astringency. **ASEAN Food Journal**, v. 12, p. 25-35, 2002.

MOREIRA, A. V. B., MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, vol. 17, p. 411-424, dez., 2004.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, vol. 1054, n. 1- 2, p. 95-111, 2004.

NEUFINGERL, N. et al. Effect of cocoa and theobromine consumption on serumHDL - cholesterol concentrations: a randomized controlled trial. **American Journal of Clinical Nutrition**, vol, 97, p1201–1209, 2013.

OETTERER, M. et al. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, ed. 1, São Paulo: Manole, p.1-94, 2006.

OROZCO, T. J.; WANG, J. F.; KEEN, C. L. Chronic consumption of a flavonols and procyanidin-rich diet is associated with reduced levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat testes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 104-110, 2003.

PELEG, H., BODINE, K.K., NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v.23, n.3, p.371-378, 1998.

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.

QUAST, L. B.; AQUINO, A. D. Oxidação dos lipídios em café arábica (*Coffea arabica* L.) e café robusta (*coffea canephora* P.). **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 325-336, 2004.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REDGWELL, R. J. et al. Cocoa bean carbohydrates: roasting-induced changes and polymer interactions. **Food Chemistry**, v. 80, p. 511–516, 2003.

RIO, F. R. **Desenvolvimento de uma cerveja formulada com gengibre (*Zingiber officinalis*) e hortelã do Brasil (*Mentha arvensis*): avaliação de seus compostos bioativos e comparação com dois estilos de cerveja existentes no mercado**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia. Rio de Janeiro, 2013.

SEATON, J. C.; CANTRELL, I. C. The determination of beer color – collaborative trial. **Journal of the Institute of Brewing**, vol, 99, p. 21–23, 1993.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**, vol. 1. Boca Raton, FL, USA: CRC Press. 2003. 576 p.

SILVA, P. H. A.; FARIA, F. C. Avaliação da intensidade de amargor e do seu princípio ativo em cervejas de diferentes características e marcas comerciais. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 902-906, out.-dez. 2008.

SIMPSON, W. J.; SMITH, A. R. W. Factors affecting antibacterial activity of hops compounds and their derivatives. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 72, n. 4, p. 327-334, 1992.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SMIT, H.J., et al, 2004. Methylxanthines are the psychopharmacologically active constituents of chocolate. **Psychopharmacology**, v. 176, p. 412–419, 2004.

SOARES, D. J. Processos oxidativos na fração lipídica de alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 30, n. 2, p. 263-272, 2012.

SOARES, N. Tempo de mudança. Engarrafador Moderno, São Caetano do Sul, n. 205, p. 14-22, 2011. Disponível em: <http://www.engarrafadormoderno.com.br/edicoes/Edicao_205.pdf>. Acesso em: 11 out. 2015.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SPENCER, J. P. E. et al. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, p. 12–22, 2008.

TECHAKRIENGKRAIL, I. et al. Relationships of sensory bitterness in lager beers to iso-alfa-acid contents. **Journal of the Institut of Brewing**, v. 110, n. 1, p. 51-56, 2004.

THAIPONG, k. et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 19, p. 669–675, 2006.

TOCOROVIC, V. Polyphenols, methylxanthines, and antioxidant capacity of chocolates produced in Serbia. **Journal of Food Composition and Analysis**. V. 41, p. 137-143, 2015.

TSCERVEJA, E. C. microcervejais e cervejarias: a história, a arte e a tecnologia. São Paulo: Aden, 2001. 233 p.

UQ (UNIVERSITY OF QUEENSLAND). School science lessons - Cocoa Project. 2017. Disponível em: <http://www.uq.edu.au/_School_Science_Lessons/55.12.GIF>. Acesso em: 31 jan. 2017.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. vol.1. São Paulo: Blucher, p. 15- 50, 2010.

WOOD, G.A. R.; LASS, R. A. **Cocoa**. 4th ed. Longman Scientific and Technical: New York. 1985.

ZHISHEN, J., MENGCHENG T. E JIANMING W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, v. 64, p. 555-559, 1999.