

CENTRO UNIVERSITÁRIO CATÓLICA DE SANTA CATARINA EM JOINVILLE

CURSO DE BIOMEDICINA

AMANDA LARISSA MOSER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Saccharomyces boulardii* NA PRODUÇÃO DE
CERVEJA PROBIÓTICA**

JOINVILLE

2017

AMANDA LARISSA MOSER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Saccharomyces boulardii* NA PRODUÇÃO DE
CERVEJA PROBIÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
para obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina pelo Centro Universitário
Católica de Santa Catarina em Joinville.

Prof. PhD. Rafael Dutra de Armas – Orientador
PhD. Pablo Angel Sanchez Podlech – Coorientador

JOINVILLE

2017

AMANDA LARISSA MOSER

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE *Saccharomyces boulardii* NA PRODUÇÃO DE
CERVEJA PROBIÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado com nota ... como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina tendo sido julgado pela Banca Examinadora formada pelos professores:

Presidente: Prof. PhD. Rafael Dutra de Armas – Orientador, CENTRO UNIVERSITÁRIO
CATÓLICA DE SANTA CATARINA EM JOINVILLE

Membro: PhD. Gabriela Müller – Proprietária, LEVTECK TECNOLOGIA VIVA LTDA.

Membro: MSc. Paulo Luiz Viteritte – Coordenador do curso de Nutrição, CENTRO
UNIVERSITÁRIO CATÓLICA DE SANTA CATARINA EM JOINVILLE

Joinville, 01 de novembro de 2017

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao (co) Orientador, prof. PhD. Pablo Angel Sanchez Podlech, agradeço por dedicar tanto de seu tempo me orientando. Seu apoio e seus ensinamentos tornaram possível realizar este trabalho. Também pela confiança, ao abrir as portas de sua casa, para utilizar todo o equipamento de fabricação de cerveja nos finais de semana.

Ao meu orientador, prof. PhD. Rafael Dutra de Armas, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelo paciente trabalho de revisão da redação.

À Gabriela Müller, e toda a equipe da empresa Levteck Tecnologia Viva Ltda., por toda ajuda e suporte na realização das análises.

Aos meus pais, irmão e irmã, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao meu namorado, Thomas, por todo amor, carinho, companhia e sorvetes.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

RESUMO

A busca por alimentos de qualidade e benéficos à saúde vem aumentando no Brasil, principalmente os alimentos funcionais, que além de promover a nutrição básica, contribuem com a saúde através da prevenção de doenças. Dentre os alimentos funcionais podemos destacar a utilização dos alimentos probióticos, que contém organismos vivos que beneficiam, principalmente, a microbiota intestinal. Aliado ao aumento da procura por alimentos saudáveis, embora contraditório, o consumo de cerveja no mundo também tem aumentado significativamente. A cerveja, quando consumida com moderação, apresenta benefícios à saúde, pois, sendo rica em flavonoides e antioxidantes, previne o envelhecimento da pele e reduz os níveis do colesterol LDL. Dessa maneira, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de *Saccharomyces boulardii* na produção de cerveja probiótica. Com base nas características benéficas dos probióticos, bem como do consumo moderado e apreciado da cerveja pela população, a produção de uma cerveja probiótica é uma tecnologia inovadora, podendo tornar-se uma alternativa benéfica para a saúde humana. Dessa forma, foram produzidas duas cervejas tipo *Pale Ale*, lote 1 (L-1) com uma mistura de *S. cerevisiae* e *S. boulardii*, e lote 2 (L-2) somente com *S. boulardii* como agente fermentador, a fim de verificar sua performance na produção de cerveja. A qualidade das cervejas produzidas foi validada através de análises físico químicas, e o seu potencial probiótico determinado pela quantificação do número de colônias presentes em L-2, após 15, 30, 45 e 60 dias do término da fabricação da cerveja. Visto que foi utilizada a mesma receita para ambas cervejas, pelas análises físico químicas classificou-se L-1 e L-2 como cervejas extra (12 a 14 %v/v), de cor clara (<20 unidades EBC), alto teor alcoólico (4,5 a 7 %v/v), puro malte e alta fermentação; todavia, devido ao teor alcoólico mais baixo em L-2 ($4,88 \pm 0,06$ %v/v), ela seria considerada ideal quando comparada a L-1 ($5,32 \pm 0,04$ %v/v) para o consumo na forma diária, indicada para alimentos probióticos. Na quantificação de leveduras, primeiramente, obteve-se os resultados em UFC mL⁻¹, os quais, depois, foram ajustados para obter os resultados referentes a uma dose, indicada para consumo diário de cerveja (300 mL), onde pode-se observar que, mesmo após 60 dias, a cerveja demonstrou contagens de *S. boulardii* >10⁸ UFC 300 mL⁻¹. Deste modo, concluiu-se que é possível utilizar *Saccharomyces boulardii* na produção de cerveja, obtendo-se uma bebida probiótica de qualidade.

Palavras-chave: Alimento funcional. Levedura. *Pale Ale*. Probiótico. Promoção da saúde.

ABSTRACT

The search for quality and health beneficial foods has been increasing in Brazil, especially functional foods, that besides basic nutrition promote and contribute health through disease prevention. Among the functional foods we can highlight the use of probiotic foods, which contain living organisms that mainly benefit the intestinal microbiota. Allied to the growing demand for healthy foods, while contradictory, world beer consumption has also increased significantly. Beer, when consumed in moderation, has health benefits as it is rich in flavonoids and antioxidants, preventing skin aging and lowering LDL cholesterol levels. This way, this project had as objective to evaluate the potential of *Saccharomyces boulardii* in the production of probiotic beer. Based on the beneficial characteristics of probiotics, as well as the moderate and appreciated consumption of beer by the population, the production of a probiotic beer is an innovative technology and can become a beneficial alternative to human health. Two *Pale Ale* beers, lot 1 (L-1) with a mix of *S. cerevisiae* and *S. boulardii*, and lot 2 (L-2) only with *S. boulardii* as fermentation agent were produced to verify their performance in beer production. The quality of the beer was validated through physical chemical analyzes, and the probiotic potential of the beers produced through the quantification of the number of colonies present in L-2, 15, 30, 45 and 60 days after the end of the brewing. Since the same recipe was used for both beers, the physical-chemical analyzes classified L-1 and L-2 as extra beers (12 to 14 %v/v), light-colored (<20 EBC units), with high alcohol content (4.5 to 7 %v/v), pure malt and high fermentation; however, due to the lower alcohol content in L-2 (4.88 ± 0.06 %v/v), it would be considered ideal when compared to L-1 (5.32 ± 0.04 %v/v) for daily consumption, indicated for probiotic foods. In the quantification of yeasts, the results were first obtained in CFU mL⁻¹, which were then adjusted to obtain the results for a dose indicated for daily consumption of beer (300 mL), so even after 60 days the beer showed *S. boulardii* counts >10⁸ CFU 300 mL⁻¹. This way, it was concluded that it is possible to use *Saccharomyces boulardii* in beer production, obtaining a quality probiotic drink.

Keywords: Functional food. Yeast. *Pale Ale*. Probiotic. Health promotion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Árvore decisória para o desenvolvimento de novos probióticos, na qual analisa-se critérios da cepa, fatores biológicos e fisiológicos da mesma.....	16
Figura 2 - Fluxograma geral das etapas de fabricação de cerveja	24
Figura 3 – Patamares de temperatura para ação das enzimas na quebra de açúcares durante a produção das cervejas.....	28
Figura 4 – Fluxograma das etapas do processo de produção da cerveja artesanal: a. moagem do malte; b. malte moído; c. adição de água; d. adição do malte; e. homogeneização; f. malte e água, liga a bomba; g. movimentação da água com a bomba de agitação e aquecimento ligados; h. cor do mosto após o ciclo de extração dos açúcares; i. retirada do malte após a extração dos açúcares; j. líquido para lavagem do malte; k. lavagem do malte; l. adição do lúpulo; m. fervura; n. resfriamento; o. transferência para o fermentador; p. fermentador; q. formação de bolhas de CO ₂ , indicador de fermentação; r. adição de primming nas garrafas já higienizadas; s. adição do líquido nas garrafas; t. cerveja pronta.....	30
Figura 5 - Características macromorfológicas de <i>S. cerevisiae</i> (metade superior) e <i>S. boulardii</i> (metade inferior) quando em meio Tecklev, após incubação de 48 horas a 30 °C.....	36
Figura 6 – Setas fechadas apontam as células leveduriformes da <i>S. boulardii</i> ao microscópio sob aumento de 40x. É possível observar leveduras pequenas, isoladas, em formato circular e levemente oval.....	37
Figura 8 - Número de UFC mL ⁻¹ de <i>S. boulardii</i> presentes no L-2 de cerveja, armazenadas em temperatura ambiente (T° ambiente) e refrigeração (T° refrigeração), no decorrer do tempo de 15 a 60 dias após o término da fabricação da cerveja (segunda fermentação).....	38
Figura 9 - Número de UFC 300 mL ⁻¹ de <i>S. boulardii</i> presentes no L-2 de cerveja, armazenadas em temperatura ambiente (T° ambiente) e refrigeração (T° refrigeração), no decorrer do tempo de 15 a 60 dias após o término da fabricação da cerveja (segunda fermentação)	39
Quadro 1 – Exemplos de algumas cepas de microrganismos probióticos que são encontradas em produtos para consumo humano, vendidos em estabelecimentos comerciais (mercados, farmácias)	15
Quadro 2 – Doses indicadas de <i>S. boulardii</i> lyo como alternativa de tratamento probiótico para diversos transtornos gastrointestinais, baseadas em evidências e relatos de estudos de casos.	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Matéria prima utilizada na fabricação de dois lotes de cervejas artesanais	28
Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas da cerveja probiótica, tipo Pale Ale, produzida artesanalmente, com mistura de leveduras <i>S. cerevisiae</i> e <i>S. boulardii</i> (L-1) e somente <i>S. boulardii</i> (L-2); realizadas na empresa Levteck Tecnologia Viva, em Florianópolis, Santa Catarina.....	35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 OBJETIVOS	10
2.1 OBJETIVO GERAL.....	10
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	10
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1 MICROBIOMA HUMANO	11
3.2 PROBIÓTICOS	12
3.2.1 Importância dos probióticos para a saúde humana	13
3.2.2 Principais organismos probióticos	14
3.3 USO DE <i>Saccharomyces boulardii</i> COMO PROBIÓTICO	17
3.4 COMERCIALIZAÇÃO DE ALIMENTOS PROBIÓTICOS	21
3.5 CERVEJA COMO ALIMENTO PROBIÓTICO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 SELEÇÃO DE CEPAS DE <i>Saccharomyces boulardii</i>	27
4.2 CERVEJA <i>PALE ALE</i>	27
4.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO ARTESANAL DA CERVEJA PROBIÓTICA	27
4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	31
4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	31
4.5.1 Diferenciação das cepas.....	32
4.5.2 Quantificação de UFC de <i>Saccharomyces boulardii</i> na cerveja do L-2 para avaliação do potencial probiótico da bebida produzida	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	34
5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA	35
5.2.1 Diferenciação das espécies de <i>Saccharomyces</i>.....	36
5.2.2 Avaliação do potencial probiótico de <i>Saccharomyces boulardii</i> produzida em L-2 pela quantificação de células viáveis	37
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42

1 INTRODUÇÃO

Em decorrência do estilo de vida moderno e tumultuado, as pessoas têm cada vez menos tempo de preparar seus alimentos; não obstante, as pessoas empenham-se em uma mudança dos hábitos alimentares em prol da saúde. Dessa forma, a busca por alimentos de qualidade e benéficos à saúde vem aumentando no Brasil. Nesse grupo de alimentos destacam-se os chamados alimentos funcionais, que são aqueles que além de promover a nutrição básica, promovem a saúde. Dentre os alimentos funcionais podemos destacar a utilização dos alimentos probióticos (DE OLIVEIRA et al., 2002).

Os probióticos são microrganismos processados a alimentos e bebidas com a finalidade de produzir efeitos benéficos à saúde dos consumidores, quando ingeridos em doses adequadas. Produtos lácteos e alimentos enriquecidos com probióticos estão entre os produtos, que utilizam essas tecnologias, mais comuns encontrados em mercados, disponíveis para consumo humano. (SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Os efeitos benéficos do uso desses microrganismos são: modulação da microbiota intestinal, reestruturação da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção de resistência gastrointestinal e urogenital à colonização por microrganismos patogênicos, estimulação do sistema imunológico, alívio da constipação intestinal, tratamento de alguns tipos de diarreias e produção de vitaminas, que podem ser absorvidas pelo hospedeiro (BEDANI; ROSSI, 2009; GUSLANDI et al., 2000; MARTINS et al., 2005b; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

Os probióticos vêm sendo estudados há décadas e seus efeitos são cientificamente comprovados. Muitos microrganismos são utilizados com essa finalidade, como por exemplo as bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Outro grupo de microrganismos com potencial probiótico, porém pouco explorado, são as leveduras (MARTINS et al., 2005a; SANTOS; VARAVALLO, 2011). As leveduras são microrganismos unicelulares pertencentes ao reino Fungi e, ainda que estudos demonstrem a existência de mais de 500 espécies de leveduras presentes em quase todos os habitats da Terra, apenas a levedura *Saccharomyces boulardii* é comercialmente utilizada como probiótico para humanos, tendo resultados positivos na recuperação de desordem gastrointestinal (SANTOS; VARAVALLO, 2011; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

A levedura *S. boulardii* foi, originalmente, extraída da lichia e, atualmente, é usada pela indústria farmacêutica no combate às diarreias alimentares, associadas a antibióticos, entre

outras. Guslandi et al. (2000), segundo estudo realizado com pacientes diagnosticados com a doença de Mal de Crohn (doença que acomete o trato intestinal), sugerem que *S. boulardii* pode representar uma boa ferramenta de manutenção do tratamento da doença. Outro estudo que confirma ação probiótico da levedura foi realizado por Madigan et al. (2010), onde resultados positivos foram obtidos após a administração de preparações de *S. boulardii* para diminuir a recorrência de infecção por *Clostridium difficile* e de diarreias agudas.

Grandes laboratórios e centros de pesquisa vem investindo no uso de probióticos como alternativa ao uso de antibióticos, uma vez que é possível produzi-los *in vitro*, com efetiva inibição de enteropatógenos. Nessa linha de raciocínio, há linhas de pesquisa que demonstram a eficiência da utilização de leveduras isoladas de cervejarias no combate de quadros de diarreia, com bons resultados apresentados através de ensaios realizados tanto *in vitro*, quanto com pacientes humanos (BODDY et al., 1991; ELMER; MCFARLAND; MCFARLAND, 2007; KOVACS; BERK, 2000).

Aliado ao aumento da procura por alimentos saudáveis, embora contraditório, o consumo de cerveja no mundo também tem aumentado significativamente. Por isso, com o propósito de aliar a busca por alimentos funcionais com o consumo de cervejas, propôs-se a produção de uma cerveja probiótica, capaz de atuar na regulação da microbiota intestinal do consumidor, proporcionando assim, a promoção da saúde humana

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo e vem sendo apreciada há mais de três milênios, sofrendo algumas modificações ao longo da história. No Brasil, começou a ser produzida no final do século XIX, e desde então o setor gera muitos empregos, tributos, rendas e benefícios sociais (ARAÚJO, 2001; FERRARI, 2008; ROSA; COSENZA; LEÃO, 2006).

A cerveja possui extratos metabólicos que auxiliam a reposição de substâncias, como aminoácidos, minerais, antioxidantes e vitaminas. Contém sódio, potássio e moléculas antioxidantes que ajudam na recuperação das perdas hídricas e normalizando as alterações do metabolismo (FREITAS et al., 2000; GHISELLI et al., 2000). Aliado a esses benefícios outras características podem ser incorporadas a cerveja a partir da utilização de leveduras probióticas (FREITAS et al., 2000; GHISELLI et al., 2000; RIQUE; SOARES; MEIRELES, 2002).

No entanto, cabe ressaltar que o consumo exagerado de álcool na forma de cerveja, pode desencadear diversas doenças, como problemas de coração, doenças hepáticas e câncer no trato digestivo e de mamas nas mulheres (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2001; DE ANDRADE; DE OLIVEIRA, 2009; RIQUE; SOARES; MEIRELES, 2002). Assim salienta-se

que o projeto não visa incentivar o consumo excessivo de cerveja, muito pelo contrário, espera-se obter uma bebida onde o efeito benéfico à saúde se dê pelo consumo moderado da mesma.

O consumo moderado de álcool vem se mostrando benéfico na redução de risco de doenças cardíacas, associado à diminuição de mortalidades causadas por doenças cardiovasculares (BOBAK; SKODOVA; MARMOT, 2000; FREITAS et al., 2000). Considera-se benéfico o consumo de um *drink* diário para mulheres e dois *drinks* para os homens. Sendo que um *drink* corresponde a 14 g de álcool, ou seja, uma lata de cerveja (RIQUE; SOARES; MEIRELES; 2002).

Com base no que foi exposto das características benéficas dos probióticos, bem como do consumo moderado e apreciado da cerveja pela população, a produção de uma cerveja probiótica é uma tecnologia inovadora que visa aliar ambos, podendo tornar-se uma alternativa benéfica para a saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de *Saccharomyces boulardii* na produção de cerveja probiótica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o potencial fermentativo de *S. boulardii* na produção de cerveja;
- Testar diferentes concentrações de *S. boulardii* e de *S. cerevisiae* na produção de cerveja probiótica;
- Diferenciar *S. boulardii* de *S. cerevisiae* após o processo de produção de cerveja probiótica;
- Validar a qualidade da cerveja obtida através de análises físico-químicas;
- Avaliar o potencial probiótico da cerveja produzida.

3 REVISÃO DE LITERATURA

A população tem se conscientizado da importância de mudar seus hábitos alimentares em prol de uma alimentação mais saudável (DE OLIVEIRA et al., 2002). Na busca por alimentos que tragam benefícios nutricionais e, que promovam a saúde, desenvolveu-se produtos probióticos, os quais conferem benefícios adicionais à saúde do consumidor, como equilíbrio para microbiota intestinal, reestruturação da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção de resistência gastrintestinal e urogenital à colonização por microrganismos patogênicos, estimulação do sistema imunológico, alívio da constipação intestinal, tratamento de alguns tipos de diarreias e produção de vitaminas, que são absorvidas pelo hospedeiro.

Além disso os probióticos devem atender a alguns requisitos básico, como: probióticos não podem ser absorvidos pela mucosa instestinal, não devem colonizar o ambiente intestinal e, conseqüentemente, não interferir negativamente sobre a microbiota intestinal (MARTINS et al., 2005b; MIGOWSKI; PUGLISESE, 2009).

3.1 MICROBIOMA HUMANO

Os seres humanos desenvolveram junto aos microrganismos uma relação íntima e complexa, na qual um ajuda o outro no exercício de viver. Há centenas de espécies de bactérias e fungos vivendo no corpo humano, seja permanentemente ou transitoriamente, constituindo a chamada microbiota normal do corpo. Em sua maioria não causam doenças e estão presentes tanto nas superfícies externas (pele e mucosa ocular) como internas (nariz, boca, trato intestinal, vagina e uretra) do corpo humano (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010).

Trabulsi e Alterthum (2008) afirmam que, mesmo em um ser saudável, as células microbianas presentes no intestino humano excedem em dez vezes o número de células humanas, ou seja, 10^{14} bactérias para 10^{13} células humanas.

A maior porção da microbiota humana acumula-se no trato gastrointestinal, mais especificamente na porção final do intestino delgado e no intestino grosso, onde as contrações musculares oscilantes são mais lentas; por isso, um terço do peso das fezes seca é composta por microrganismos, ou seja, entre cem bilhões (10^{11}) e cem trilhões (10^{14}) de bactérias são eliminadas por dia, por uma pessoa (MADIGAN, 2010).

Em uma pessoa saudável, a microbiota intestinal tem funções essenciais para a vida humana: ela é capaz de degradar açúcares não digeríveis em ácido lático e ácidos graxos (ômega-6 e ômega-3), também interage na função intestinal ao auxiliar a secreção e absorção de nutrientes e oportunizar a síntese das vitaminas B e K. Conjectura-se que os microrganismos residentes no trato intestinal realizam outras funções, ainda por serem elucidadas, uma vez que a própria composição da microbiota não é totalmente conhecida (INGRAHAM; INGRAHAM, 2010).

As principais classes de microrganismos endógenos encontradas na microbiota normal do intestino são aeróbias, anaeróbias facultativas e anaeróbias estritas, sendo esta última predominante às outras, devido ao fato que há um baixo potencial de oxirredução no íleo (BLACK, 2013). Estima-se que há cerca de 500 espécies pertencentes a 200 gêneros, porém somente 20 delas foram significativamente representadas. Dentre estas, os gêneros que mais se destacam são *Bacteroides sp.*, *Bifidobacterium sp.*, *Fusobacterium sp.*, *Lactobacillus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Clostridium sp.* e a família *Enterobacteriaceae*. (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Porém, tratamentos com antibióticos, antígenos alimentares, patógenos, substâncias químicas e radiação podem provocar efeitos deletérios sobre a microbiota, levando a um desequilíbrio da microbiota, desordem da permeabilidade e até a ativação de substâncias carcinogênicas (MADIGAN, 2010).

Pela importância destacada da microbiota intestinal diante de possíveis desequilíbrios da microbiota como diarreia, infecções, lesões, tumores malignos, crescimento de microrganismo exógeno tóxico e demais enfermidades, são administrados alimentos probióticos para reequilibrar e regularizar a microbiota intestinal concomitantemente à outros medicamentos (DE ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011).

3.2 PROBIÓTICOS

A palavra "probiótico" é oriunda do grego e significa "para vida", ou seja, aquele que é em favor da vida. Os probióticos são bactérias ou leveduras vivas, não patogênicas, de cultura única ou mista, que são adicionados a alimentos e/ou bebidas com a finalidade de produzir efeitos benéficos à saúde como, por exemplo, regular a microbiota intestinal do hospedeiro. (DE ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011).

3.2.1 Importância dos probióticos para a saúde humana

Um bom microrganismo, para ser considerado como probiótico, não deve apresentar perigo à saúde de quem o irá consumir, além de ser capaz de permanecer vivo, desde a fase de produção do alimentos até o destino final, ou seja, o sistema digestório do consumidor, e deve ter sua eficácia comprovada (DE ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011).

Por isso, nos últimos 20 anos, vem sendo feita uma investigação clínica relevante a respeito dos probióticos e da sua utilização terapêutica (INSTITUT ROSSEL LALLEMAND, 2014a). A principal teoria que explica os processos individuais e associativos é a "exclusão competitiva", a qual se baseia no princípio: se a parede do epitélio intestinal estiver ocupada por probióticos, visto que eles o colonizam por um curto período de tempo (dois a cinco dias) e em seguida são eliminados, outros microrganismos (patogênicos) não terão um local para se aderir e conseqüentemente, não formarão colônias. Deste modo, estes serão eliminados com o bolo alimentar e não causarão doenças e, conseqüentemente, a microbiota natural pode se desenvolver, estimulada pelos probióticos (DE ÁVILA; RIGOBELLO; MALUTA, 2011; DE OLIVEIRA et al., 2002).

À vista disso, os probióticos vem sendo usados no tratamentos de algumas doenças intestinais (principalmente, em diarreias agudas), para minimizar os efeitos desfavoráveis decorrentes dos desequilíbrios que a microbiota intestinal sofre por diferentes motivos, como já destacado anteriormente, uma vez que desempenham várias funções no organismo; estas funções são classificadas por Naidu e Clemens (2000) em três classes: nutricionais, fisiológicas e antimicrobianas. De Ávila, Rigobelo e Maluta (2011) destacam algumas das funções dos probióticos:

- Inibição de infecções intestinais: proporcionam estabilidade à barreira intestinal (o epitélio intestinal + a microbiota normal).
- Melhor digestibilidade: degradam frações de proteínas, lipídeos e glicídios; aumentam a absorção e fixação de ferro e cálcio; melhoram o valor nutritivo dos alimentos ao elevarem o nível de vitaminas do complexo B; favorecem a utilização da lactose.
- Colonização do intestino: aderem-se ao epitélio intestinal, assim, exercem ação antagônica aos patógenos, inibindo a adesão e ativação destes.
- Combate ao mau hálito: alguns microrganismos inibem o crescimento de bactérias causadoras do mau hálito.

- Ação anticarcinogênica: reduzem enzimas promotoras de câncer ao transformar potenciais pré-carcinogênicos em substâncias menos danosas; inibem alguns tipos de cancro.
- Ação hipocolesterolêmica: geram inibidores para a síntese de colesterol; por assimilação, utilizam o colesterol; precipitam o colesterol através de sais biliares desconjugados.
- Modulação imunitária: atuam como biorreguladores por serem fontes de enzimas e fatores que estimulam a produção de macrófagos, células supressoras e interferon β .

No entanto, é importante salientar que, as bactérias probióticas só apresentam efeitos biológicos no ambiente intestinal se atingirem o mesmo com tamanho populacional mínimo (DE OLIVEIRA et al., 2002). Além disso, nem todos os probióticos apresentam o mesmo mecanismo de ação e função no organismo humano, uma vez que eles são variados, abrangendo gêneros bacterianos e fúngicos. (INSTITUT ROSSEL LALLEMAND, 2014a; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009.).

3.2.2 Principais organismos probióticos

Os principais microrganismos probióticos são bactérias (em sua maioria) e leveduras. O Quadro 1 exibe alguns exemplos de cepas de probióticos que são encontradas em produtos, vendidos em mercados, para consumo humano. Os mais comuns são produtos lácteos e alimentos enriquecidos com probióticos. Há também produtos com bactérias liofilizadas, as quais são encontradas em comprimidos, cápsulas e sachês.

Eles podem ser divididas em duas classes, de acordo com o seu produto: ácido láctico e fermentação. As bactérias produtoras de ácido láctico recebem essa nomenclatura por produzirem ácido-lático a partir de carboidratos (OMG, 2008).

Elas têm como correspondentes as espécies de *Lactobacillus*, *Lactococcus*, e *Streptococcus thermophilus*, as quais são bactérias não patogênicas, não toxigênicas, Gram positivas, e muito utilizadas na fermentação de alimentos, estimulação da imunidade, putrefação, digestão e absorção de nutrientes, síntese de vitaminas e inibição do crescimento de bactérias exógenas e tóxicas. Ainda neste grupo, estão incluídas bactérias do gênero *Bifidobacterium*; responsáveis pelas mesmas funções, porém com diferenças taxonômicas (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Por sua vez, as leveduras fermentadoras são usadas no processo de transformação de alimentos em outros produtos finais de metabolismo, como etanol. O principal representante deste grupo é a levedura do gênero *Saccharomyces*.

Quadro 1 – Exemplos de algumas cepas de microrganismos probióticos que são encontradas em produtos para consumo humano, vendidos em estabelecimentos comerciais (mercados, farmácias)

Cepa	Produto comercializado
<i>Bifidobacterium animalis</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus johnsonii</i>	Iogurte
<i>Bifidobacterium breve</i> <i>Lactobacillus casei</i>	Leite fermentado
<i>Bifidobacterium infantis</i> <i>Enterococcus</i>	Concentrado, cápsula
<i>Bifidobacterium lactis</i> <i>Bifidobacterium longum</i>	Concentrado, sachê
<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Suco
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Concentrado, gotas
<i>Saccharomyces boulardii</i> *	Concentrado, cápsula

*Única levedura comercializada como probiótico humano.

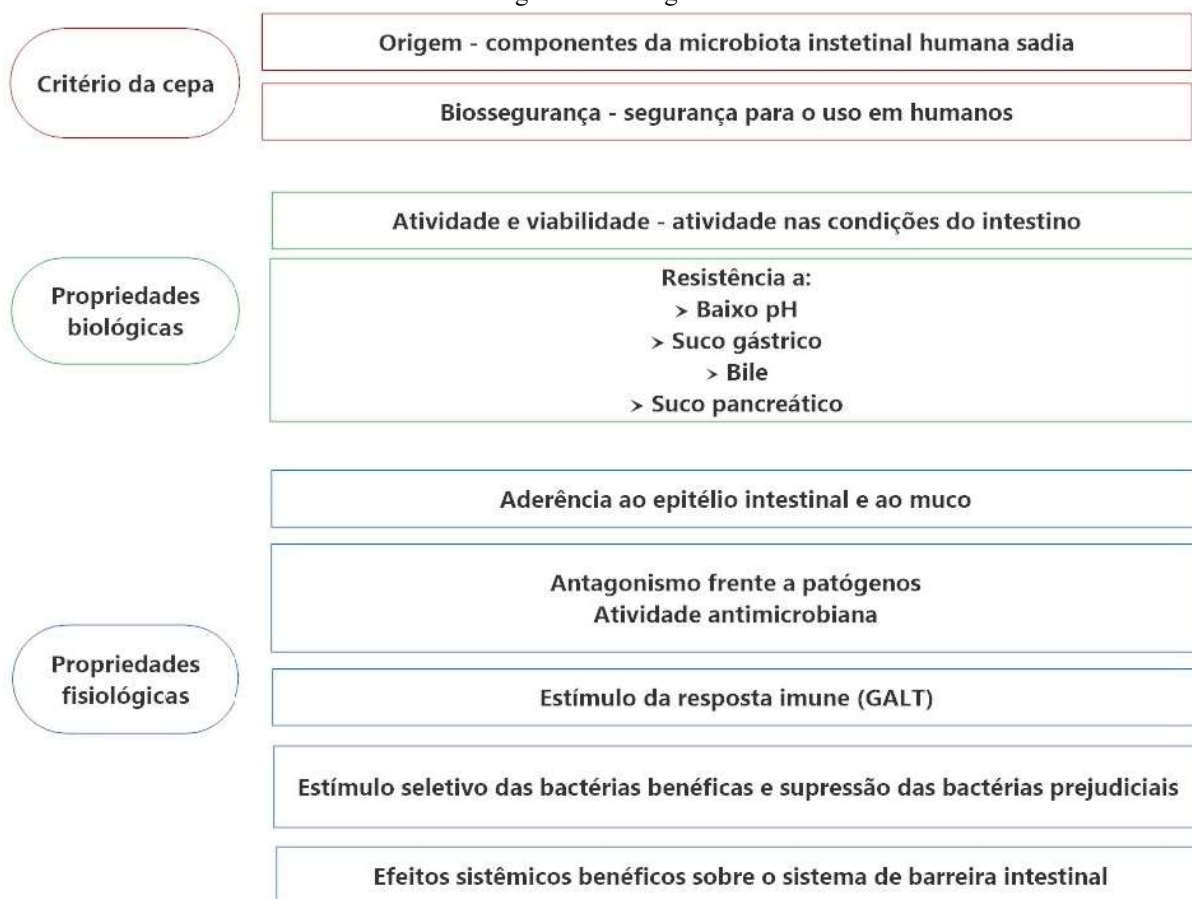
Fonte: adaptado de OMG (2008).

De acordo com De Oliveira et al. (2002), a seleção e escolha de probiótico leva em consideração os seguintes critérios preferenciais:

- O gênero, ao qual pertence o microrganismo, deve ser de origem humana;
- A estabilidade frente à acidez estomacal e à bile;
- A capacidade de aderir à mucosa intestinal;
- A capacidade de colonizar o trato gastrointestinal humano (mesmo que um período de tempo curto);
- A capacidade de produzir compostos antimicrobianos;
- Ser metabolicamente ativo no intestino;
- Apresentar segurança para uso humano;
- Ter histórico de não patogenicidade;
- Não estar associada a outras doenças (endocardite, por exemplo);
- Ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos.

A partir desses critérios, criou-se um fluxograma, o qual apresenta todos os itens de base, em forma de uma árvore decisória para o desenvolvimento de novos probióticos, a qual pode ser analisada na Figura 1.

Figura 1 - Árvore decisória para o desenvolvimento de novos probióticos, na qual analisa-se critérios da cepa, fatores biológicos e fisiológicos da mesma



Fonte: adaptado de De Oliveira et al. (2002).

Na árvore decisória são analisados três principais aspectos: critérios da cepa, como origem e biossegurança; fatores biológicos como atividade e viabilidade, e a resistência ao ambiente do trato gastrointestinal (pH baixo, suco gástrico, bile e suco pancreático); e os fatores fisiológicos, os quais envolvem atividade antagonista frente a patógenos, aderência ao epitélio, atividade antimicrobiana, estímulo da resposta imune, estímulo e supressão de bactérias, e efeitos sistêmicos benéficos sobre o sistema de barreira intestinal.

Embora as bactérias sejam as mais empregadas, leveduras também possuem potencial para serem utilizadas como probióticos, onde destaca-se *S. boulardii*, sendo a única levedura utilizada como microrganismo de efeito probiótico humano, enquanto, *S. cerevisiae* é outra

levedura probiótica utilizada na medicina veterinária (SANTOS; VARAVALLO, 2011; WHITE; ZAINASHEFF, 2010).

A vantagem de se trabalhar com leveduras é que elas podem ser liofilizadas, são eliminadas de 2 a 5 dias após a administração diária, como forma de tratamento, e não são afetadas pelo uso de antibióticos, os quais são bactericidas e bacteriostáticos, ou seja, seu fármaco não tem efeito sobre fungos (leveduras) (BODDY et al., 1991). Outra característica importante do uso de leveduras como probióticos é sua capacidade de sintetizar vitaminas no complexo B e, conseqüentemente, possibilitar a suplementação dessas vitaminas na alimentação humana (GUSLANDI et al., 2000; MARTINS et al., 2005b).

3.3 USO DE *Saccharomyces boulardii* COMO PROBIÓTICO

A levedura *S. boulardii* pertence ao filo Ascomycota, ordem Saccharomycetales e família *Saccharomycetaceae*. Foi descoberta e isolada da casca de frutas como lichias e mangostões, no século XX, no ano 1923, pelo cientista francês Henri Boulard, ao observar que os indígenas locais na Indochina (península no sudeste da Ásia, atual Vietnã) usavam essas cascas como tratamento antidiarréico (INSTITUT ROSSEL LALLEMAND, 2014b; McFARLAND; BERNASCONI, 1993).

Pertence à mesma família de *Saccharomyces cerevisiae*, levedura empregada na fabricação de cervejas, e da qual difere em níveis genéticos, metabólicos e fisiológicos. Assim como *S. cerevisiae* é unicelular, globular e se reproduz por brotamento, o que deixa cicatrizes em sua superfície. (INSTITUT ROSSEL LALLEMAND, 2014b).

É uma levedura tropical, não patogênica e não sistêmica (permanece no trato gastrointestinal, sem espalhar-se pelo corpo) crescendo em temperaturas de 37 °C. Além disso, é uma levedura probiótica, utilizada na forma liofilizada e por isso, é frequentemente referida como *S. boulardii* Iyo. Quando liofilizadas, as células se apresentam oval arredondadas, medindo entre 8 e 12 µm de comprimento e 4 a 6 µm de largura. São naturalmente resistentes aos antibióticos, sensíveis aos antifúngicos e sensíveis a temperaturas elevadas (> 50°C) (FLORATITUDE, 2014).

Desde 1974, a empresa Biocodex comercializa as células de *S. boulardii* liofilizadas sob nome Ultra-Leve; o que só foi possível, após Henri Boulard vender seus direitos à empresa, em 1947 em Paris, França (FLORATITUDE, 2014).

McFarland e Bernasconi (1993, p.157) afirmam que, com uma administração diária, *S. boulardii* atinge e mantém um nível elevado estável na fase estacionária conforme demonstram dados farmacocinéticos; e uma vez que o agente é descontinuado, é eliminado nas fezes rapidamente.

Isto posto, é importante enfatizar que a dose de probiótico varia de acordo com cepa, produto, paciente e tipo de tratamento. A maioria dos produtos de venda livre que contém probióticos em sua composição, disponibilizam entre 1–10 bilhões de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)/dose. À medida que alguns produtos demonstram eficácia nesta dose, outros funcionam a níveis mais baixos e outros ainda demandam quantidades muito maiores (OMG, 2008). Exposto isso, o Quadro 2 apresenta, como exemplo, a dose recomendada de *S. boulardii* liofilizado conforme o transtorno a ser tratado.

Quadro 2 – Doses indicadas de *S. boulardii* lio como alternativa de tratamento probiótico para diversos transtornos gastrointestinais, baseadas em evidências e relatos de estudos de casos.

Transtorno	Dose recomendada
Tratamento da diarreia aguda infecciosa em crianças	200 mg, três vezes ao dia
Prevenção da diarreia associada a antibióticos em crianças	250 mg, duas vezes ao dia
Prevenção da diarreia associada a antibióticos em adultos	1g ou 3×10^{10} UFC ao dia
Prevenção da diarreia por <i>C. difficile</i> em adultos	2×10^{10} UFC ao dia
Terapia adjuvante para erradicação de <i>H. pylori</i>	1g ou 5×10^9 UFC ao dia

Fonte: adaptado de OMG (2008).

Até o momento, estudos ostentam a informação, na qual a microbiota intestinal pode ser mudada qualitativa e quantitativamente, de modo rápido, devido à administração de probióticos, como *S. boulardii*. Todavia, após um curto período de tempo, a microbiota intestinal volta ao seu estado normal (MADIGAN et al., 2010).

Sabendo que *S. boulardii* liofilizado é um probiótico, cuja definição é um microrganismo vivo que, quando administrado em quantidade suficiente, traz benefícios para a saúde do hospedeiro (FLORATITUDE, 2014); nos próximos parágrafos serão apresentados, de modo sucinto, alguns estudos realizados com *Saccharomyces boulardii*, que surtiram efeitos positivos ao ser usado como forma alternativa ou complementar de tratamento a doenças infecciosas intestinais.

Em 1994, McFarland realizou um estudo com 124 pacientes adultos (60 anos de idade) que tinham história de pelo menos um episódio de doença associada a *C. difficile* (do inglês, *Clostridium difficile Disease*, ou CDD), também conhecida como colite pseudomembranosa (CPM). O bacilo Gram-positivo *C. difficile* é natural da microbiota intestinal, cujas toxinas causam desde diarreia ligeira a colite pseudomembranosa. A CPM é uma doença infecciosa, que surge na maioria dos casos após antibióterapia, uma vez que os antibióticos provocam a alteração da microbiota intestinal normal permitindo a colonização pelo *C. difficile*, que em condições apropriadas leva à ocorrência dos sintomas: presença de placas amarelas ou pseudomembranas na mucosa do cólon com severa inflamação (FERREIRA, 2013).

No estudo de McFarland (1994), como tratamento foi avaliado a levedura *S. boulardii* (1 g/dose) com um antibiótico (Cloridrato de Vancomicina ou Metronidazol), durante 4 semanas. A análise multivariada revelou que os pacientes tratados com *S. boulardii* e antibióticos padrão tiveram um menor risco relativo de recorrência de CDD em comparação com placebo e os antibióticos convencionais, porém nenhum benefício de *S. boulardii* foi constatado para pacientes com um episódio inicial de CDD. Além disso, não houve reações adversas graves associados ao *S. boulardii*.

No ano seguinte (1995), McFarland determinou a segurança e a eficácia de um novo agente profilático preventivo, *S. boulardii* liofilizado (na dose de 1 g/dia), para o tratamento de diarreia associada a antibióticos (DAA), em um grupo de alto risco de 193 pacientes hospitalizados que receberam pelo menos um antibiótico β -lactâmico. Os pacientes foram acompanhados durante 7 semanas e a prevenção de DAA foi de 51 % para os pacientes que receberam *S. boulardii*, sem reações graves adversas.

Em 1997, avaliou-se o efeito preventivo do *S. boulardii* (500 mg, quatro vezes ao dia) e fatores de risco para diarreia em um total de 128 pacientes internados em unidades de terapia intensiva de hospitais gerais e alimentados por tubos em estado crítico. Para o grupo de pacientes tratados com *S. boulardii*, ou seja, metade do total (64), o percentual médio de dias com diarreia por dia de alimentação reduziu significativamente (BLEICHNER, 1997).

Por sua vez, Guslandi, Giollo e Testoni (2003), relataram que *S. boulardii* pode ser benéfico no tratamento e manutenção da doença de Crohn. Para avaliar esta sentença, um grupo de 25 pacientes com uma ligeira a moderada colite ulcerativa recebeu junto a mesalazina, um tratamento adicional com *S. boulardii* (250 mg, três vezes ao dia) durante quatro semanas. Dos 24 pacientes que completaram o estudo, 17 atingiram remissão clínica; o que foi confirmado

por endoscopia, comprovando assim, que estudos controlados com este agente probiótico são garantidos e eficazes no tratamento de colite ulcerativa.

Deste modo, os estudos desses autores vêm ao encontro do que se esperava, no sentido de mostrar que o tratamento por ingestão de probióticos resulta em melhoria da qualidade de vida de indivíduos com doenças crônicas mediadas pelo sistema imunológico, como as doenças inflamatórias intestinais (doença de Crohn e colite ulcerativa) (DE OLIVEIRA et al., 2002).

Adicionalmente, Liong (2011) afirma que *S. boulardii* também é efetivo no tratamento de intolerância a lactose, infecções do trato urinário, micoses vaginais, níveis de colesterol alto, urticária, bolhas de febre, aftas, acne na fase da adolescência e alergias alimentícias.

Para efeitos metodológicos no entanto, é importante destacar também estudos que revelam que nem sempre o uso de probióticos no tratamento de doenças infecciosas intestinais é benéfico ao paciente. Em casos raros, pode ocorrer uma fungemia por administração de *S. boulardii* em pacientes com um cateter venoso central e imunocomprometidos.

No ano de 2000, Hennequin et al. explanam que houveram, ainda que raros, quatro casos de fungemia por *S. boulardii* em pacientes com cateter vascular residente. Pelo fato de não haver relatos a respeito do envolvimento de órgãos, choque séptico ou outra etiologia, presumiram que a contaminação do cateter pode ter sido pelo ar, superfícies ambientais ou as mãos após a abertura das cápsulas de *S. boulardii*. Os autores sugerem que os pacotes devem ser abertos com luvas, do lado de fora do quarto do paciente para evitar a contaminação do cateter.

Cassone et al. (2003), comunicaram um surto de fungemia por *S. boulardii* entre três colegas de quarto da unidade de terapia intensiva, que receberam preparações liofilizadas desta levedura. Suspeita-se que as fungemias foram provocadas pela contaminação ao cateter venoso central, e resolvidas após o tratamento com Fluconazol. Os autores reforçam a necessidade de uma aplicação rigorosa da higiene adequada, principalmente quando se utiliza uma preparação deste organismo probiótico.

Em um caso mais recente, datado do ano de 2012, Thygesen, Glerup e Tarp apresentam o caso de uma mulher de 79 anos com artrite reumatóide, que após uma ressecção intestinal desenvolveu fungemia por *S. boulardii*. A evolução pós-operatória foi complicada por problemas nutricionais, anemia e várias infecções hospitalares, incluindo *C. difficile* com diarreia recorrente associada. Assim, os autores acham importante lembrar aos clínicos o risco ao prescrever probióticos, especialmente para pacientes imunocomprometidos.

Dessa forma, os relatos de fungemia por *S. boulardii* como efeito colateral raro, e outras sérias complicação do tratamento com probióticos, mostram de forma evidente que conhecer os efeitos positivos e negativos deste tipo de intervenção e a necessidade da higienização por parte da equipe de saúde são essenciais para o sucesso da terapia.

Em suma, é possível declarar que o processamento, uso e tratamento com probióticos vem resultando em produtos com alto grau de aceitabilidade, nos quais a sua viabilidade e funcionalidade são mantidas (DE OLIVEIRA et al., 2002).

3.4 COMERCIALIZAÇÃO DE ALIMENTOS PROBIÓTICOS

A importância da dieta, associada a um estilo de vida saudável, uma vez que esta pode contribuir à prevenção de doenças e promoção da saúde, levou à criação de um mercado para produtos funcionais e probióticos (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, 2005).

A definição aceita pela *European Commission Concerted Action on Funcional Food Science in Europe* (1999) descreve os alimentos funcionais como “alimentos para os quais pode-se satisfatoriamente demonstrar que eles afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, além de garantirem efeitos nutricionais adequados, conduzindo a uma melhoria do estado de saúde e bem estar e/ou a uma redução do risco de doenças”. Desse modo, os alimentos probióticos entram nessa categoria, e segundo a ANVISA (2008), baseando-se na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos, recomenda-se o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC dia⁻¹.

Os principais alimentos probióticos comercializados atualmente são de origem laticínia, visto que contribuem para a sobrevivência dos probióticos ao suco gástrico, tendo em vista seu efeito tamponante e protetor (ROSS; DESMOND; STANTON, 2005). Leites, iogurtes e leites fermentados são os principais alimentos utilizados como probióticos, no entanto, a variedade desses produtos continua em expansão englobando ainda queijos, sobremesa com base láctea – caso do *frozen yogurt*, do sorvete e do mousse – e até o kefir (bebida fermentada) (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Além disso, visando o público adepto ao vegetarianismo, a soja aparece como um substituto ideal para o consumo de produtos probióticos lácteos, promovendo a saúde através de características nutricionais intrínsecas por meio da ingestão do leite de soja, extrato solúvel

de soja e sobremesa não fermentada vegetariana congelada (BEHRENS; ROIG; SILVA, 2004; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Champagne, Gardner e Roy (2005) enumeraram outros produtos que vêm sendo estudados quanto ao seu potencial como veículo de microrganismos probióticos, entre eles destaca-se maionese, carnes, alimentos infantis, produtos de confeitaria, patês, extratos de sementes vegetais, suco de pepino, produtos de peixe e kimchi (produto vegetal fermentado de origem coreana).

A evolução acelerada dos conhecimentos científicos sobre a atuação dos alimentos probióticos sobre a saúde do hospedeiro certamente resulta na ampliação do leque de opções de produtos probióticos disponíveis ao consumidor (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Assim sendo, o que se espera é que as inovações resultem em produtos probióticos mais diversificados que visem contribuir com a melhoria da saúde do consumidor, como é o caso da proposta deste trabalho. Afinal, por que não, aliar um consumidor mais consciente e com estilo de vida equilibrado e sua busca por alimentos funcionais, à predileção nacional pela cerveja?

3.5 CERVEJA COMO ALIMENTO PROBIÓTICO

Segundo o Decreto de Lei nº 6.871, de 4 de junho de 2009; art. 36; "cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo".

A cerveja é considerada uma paixão nacional em diversos países; vale ressaltar que no Brasil, como paixão nacional, ela só perde a "medalha de ouro" para o futebol. Segundo uma pesquisa da Kantar IBOPE Media, ela é a bebida preferida na hora de comemorar bons momentos (64 %), conforme apresenta a pesquisa realizada pelo Ibope, no final do ano de 2013, no Brasil.

É interessante acrescentar ainda que, como bebida mais consumida, a cerveja está entre as cinco primeiras, perdendo somente para a água, o chá e o café. Assim é facilmente verificável que a cerveja se encontra em primeiro lugar no *ranking* das bebidas alcoólicas mais consumidas no mundo, seguida do vinho, do saquê e dos destilados (LARANJEIRA et al., 2007). Em 2008, o Brasil era o nono maior consumidor de cerveja do mundo, com uma média de 47,6 litros/ano por habitante (SIQUEIRA; BOLINE; MACEDO, 2008).

Para suprir essa enorme quantidade de consumo, é necessário uma produção/demanda igualmente grande. Frente a isto, o *ranking* mundial de produção de cerveja, por volume no ano

de 2008 constava, em primeiro lugar, a China produzindo 27 bilhões de litros/ano, seguida pelos Estados Unidos com 23,6 bilhões de litros/ano, Alemanha com 10,5 bilhões de litros/ano, Rússia com 9 bilhões de litros/ano e, em quinto colocado, o Brasil produzindo 8,5 bilhões de litros/ano (SIQUEIRA; BOLINE; MACEDO, 2008).

As cervejarias fazem parte de um dos setores que mais crescem no Brasil, correspondendo a 2 % do PIB nacional e 15% da indústria, segundo estudo realizado em 2013 pela Fundação Getúlio Vargas. Por contribuir fortemente para o desenvolvimento econômico e social do Brasil favorece seu crescimento sustentável (ARAUJO, 2001; CERVBRASIL, 2014; FERRARI, 2008), sendo um dos setores mais relevantes da economia brasileira com investimentos de R\$ 17 bilhões entre 2010 e 2013 e gerando cerca de 2,7 milhões de empregos no Brasil. Apenas nas regiões Sul e Sudeste do Brasil existem mais de 200 micro cervejarias instaladas, além de inúmeros produtores caseiros (CERVBRASIL, 2014; FERRARI, 2008; MIGOWSKI; PUGLISESE, 2009; SANTOS; VARAVALLO, 2011).

De modo geral, as principais etapas da fabricação de cerveja são, na sequência: malteação, moagem do malte, mosturação (adição da água e malte, alta temperatura e agitação), brassagem (extração dos açúcares), fervura, resfriamento, fermentação, maturação, refermentação (*priming*), embalagem e pasteurização. Quando pronta, ela é distribuída para consumo. A Figura 2 apresenta um fluxograma geral e resumido das etapas de fabricação de cerveja.

Os ingredientes por sua vez, foram padronizados pela *Reinheitsgebot* (lei de Pureza), em 1516 na Alemanha, e são permitidos somente água, malte, lúpulo e levedura na sua produção. A água é tão importante que, basicamente, define o local de instalação da cervejaria, pois para cada litro de cerveja são utilizados entre 3 e 5 litros de água, e representa 85% e 92% da composição da cerveja (D. JUNIOR et al., 2009).

O malte, de acordo com Resolução - CNNPA nº 12, de 1978, da ANVISA, é definido como "o produto resultante da germinação e posterior dessecação do grão de cevada *Hordeum sativum* ou de outros cereais" e é responsável por conferir principalmente a cor da cerveja. Já "o lúpulo (*Humulus lupulus L.*) é uma trepadeira perene, cujas flores fêmeas apresentam grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais, os quais conferem à cerveja o sabor amargo e o aroma que caracterizam a bebida" segundo D. Junior et al. (2009, p.65) e Massambani et al. (2009, p. 355). Por sua vez, a levedura, por meio da fermentação produz etanol, dióxido de carbono e outros compostos que ativam o aroma. São esses subprodutos de fermentação que distinguem um produto específico cerveja de outro produto compatível (SMART, 2003).

Figura 2 - Fluxograma geral das etapas de fabricação de cerveja



Fonte: <https://www.starkerfreshbeer.com/brewery/>

As leveduras mais utilizadas em cervejaria são *S. cerevisiae* e *Saccharomyces pastorianus*, sendo a *S. cerevisiae* uma levedura de alta fermentação, ou seja, a maior parte desta etapa se produz na parte superior do fermentador e é característico das cervejas *Ales*; por sua vez, *S. pastorianus* é uma levedura de baixa fermentação, a qual é considerada de qualidade se permanecer em suspensão durante a fase ativa da fermentação e então flocular e sedimentar, caracterizando a fermentação de cervejas tipo *Lager* (D. JUNIOR et al., 2009. PALMER, 2006).

Dessa forma, pode-se considerar que cepas de leveduras variam em suas propriedades, consequentemente, variam também os sabores que estas conferem às cervejas, ainda que todas realizem o mesmo trabalho de transformar açúcar em álcool e gás carbônico, basicamente. Palmer (2006) acrescenta ainda que, além do etanol e gás carbônico, a levedura produz outros componentes como ésteres, alcoóis superiores, cetonas, fenóis e ácidos graxos.

Compostos aromáticos desempenham importante papel no aroma e sabor de bebidas alcoólicas derivadas de fermentações desempenhadas por leveduras e contribuem assim para a aceitação ou não do produto pelo mercado consumidor. Ésteres voláteis, por exemplo, são responsáveis pelo aroma frutado de bebidas fermentadas e consequentemente constituem um grupo vital de compostos aromáticos desejáveis em cervejas (SOUZA, 2010).

Sem pormenorizar, a principal via catabólica de açúcar para leveduras é a via glicolítica, visto que ela opera em condições tanto aeróbicas quanto anaeróbicas, detém 35 a 65% das enzimas totais e é a via na qual 70 % dos açúcares, hexoses exógenas, são assimilados (BRIGGS et al., 2011).

O metabolismo fermentativo em meio propício (contendo glicose e outros açúcares fermentáveis) acontece, independente se há presença ou não de oxigênio, pois um fenômeno chamado repressão da glicose inibe a expressão dos genes codificadores das vias puramente oxidativas. Além disso, as enzimas responsáveis pela utilização de fontes oxidativas de carbono (etanol e glicerol) não são sintetizadas e consequentemente o desenvolvimento mitocondrial é bloqueado (BRIGGS et al., 2011).

Por outro lado, se há o esgotamento de glicose no meio, há uma fase de retardamento onde ocorrem mudanças no metabolismo – o que antes estava inibido e bloqueado, torna-se ativo – para a adaptação fenotípica. Desse modo, surge o fenômeno de crescimento bifásico, no qual o metabolismo passa a ser tanto fermentativo (consumidor de glicose) quanto oxidativo (consumidor de etanol). Isso resulta em um segundo período de crescimento utilizando um substrato alternativo (BRIGGS et al., 2011).

Essa diferenciação está relacionada a variações de ambiente que acarretam estresses biológicos, químicos e físicos contra a levedura. Segundo Smart (2003), para cada tipo de estresse que a levedura sofre, há uma resposta. E esta varia de acordo com cada espécie. Os principais tipos de estresse são a mutação gênica, a presença de etanol, o estresse físico, o estresse osmótico e o estresse oxidativo (todos causados durante a fermentação e manuseio da levedura).

Como destacado anteriormente, a levedura mais utilizada na fabricação de cerveja é a *S. cerevisiae*. A partir dessa afirmação, tem-se a possibilidade de utilizar a *S. boulardii* na fabricação de cerveja, visto que apesar das pequenas diferenças genéticas, metabólicas e fisiológicas, faz parte do mesmo gênero e, quando na ausência de oxigênio fermenta carboidratos, produzindo etanol e dióxido de carbono e subprodutos ao emergir a superfície do líquido em alta temperatura (15-20 °C) (PALMER, 2006).

Por conseguinte, levando em consideração as características já citadas de *S. boulardii*, procurou-se um estilo de cerveja que fosse compatível com a mesma, ou seja, uma *Ale* (alta fermentação). A fermentação em cervejas *Ale* ocorre rapidamente e devido a alta temperatura, há maiores níveis de éster, proporcionando um sabor frutado (PALMER, 2006).

Consequentemente, a fim de aproveitar essa característica frutada, optou-se por produzir uma cerveja tipo *Pale Ale*, sendo esta menos amarga que as demais, pois é desenvolvida principalmente com lúpulo aromático, o que dá destaque aos sabores levemente frutados derivados dos ésteres. Agrada tanto homens quanto mulheres e harmoniza muito bem com comidas apimentadas devido à sensação refrescante.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE CEPAS DE *Saccharomyces boulardii*

A espécie em foco, *S. boulardii* foi obtida a partir do produto comercial (Floratil[®], Merck). Cada cápsula de 200 mg contém cerca de 1×10^9 células de *S. boulardii*-17 na forma liofilizada.

Para a produção do primeiro lote de cerveja, também foi utilizado *S. cerevisiae* obtida comercialmente pelo nome Safale-S04 (Fermento Fermentis[®]). Cada sachê de 11,5 g contém cerca de 6×10^9 células grama⁻¹. A levedura *S. cerevisiae* foi adicionada devido ao potencial fermentativo conhecido, visto que é utilizado há muito tempo na fabricação de cerveja.

4.2 CERVEJA PALE ALE

Como descrito e elucidado anteriormente, a partir da levedura selecionada para produção de cerveja, o tipo de cerveja que se busca produzir com *S. boulardii* é uma *Pale Ale*, teor alcoólico 4,8% e *International Bitterness Unit* (IBU, unidade internacional de amargor) 14, com coloração âmbar e alta fermentação, puro malte, produzindo pouco colarinho devido à baixa cabornatação. Oferece um sabor inigualável, paladar seco e levemente frutado devido aos altos níveis de ésteres, com destaque para seu amargor mais suave característico do lúpulo; ótima harmonização com comidas apimentadas. Temperatura ideal de consumo entre 1 e 5 °C.

4.3 PROCESSO DE PRODUÇÃO ARTESANAL DA CERVEJA PROBIÓTICA

Para elaboração das cervejas artesanais do primeiro (L-1) e segundo (L-2) lotes utilizou-se a matéria prima descrita na Tabela 1, e o equipamento para produção de cerveja artesanal Biermatik[®]. Além disso, durante o processo de produção, monitorou-se a densidade do líquido e a concentração de açúcar no meio (°Brix), com um densímetro e um refratômetro, respectivamente.

Previamente à produção das cervejas, o equipamento, as garrafas e as tampas foram lavadas com água e detergente e então sanitizadas com solução de iodo e álcool 70%.

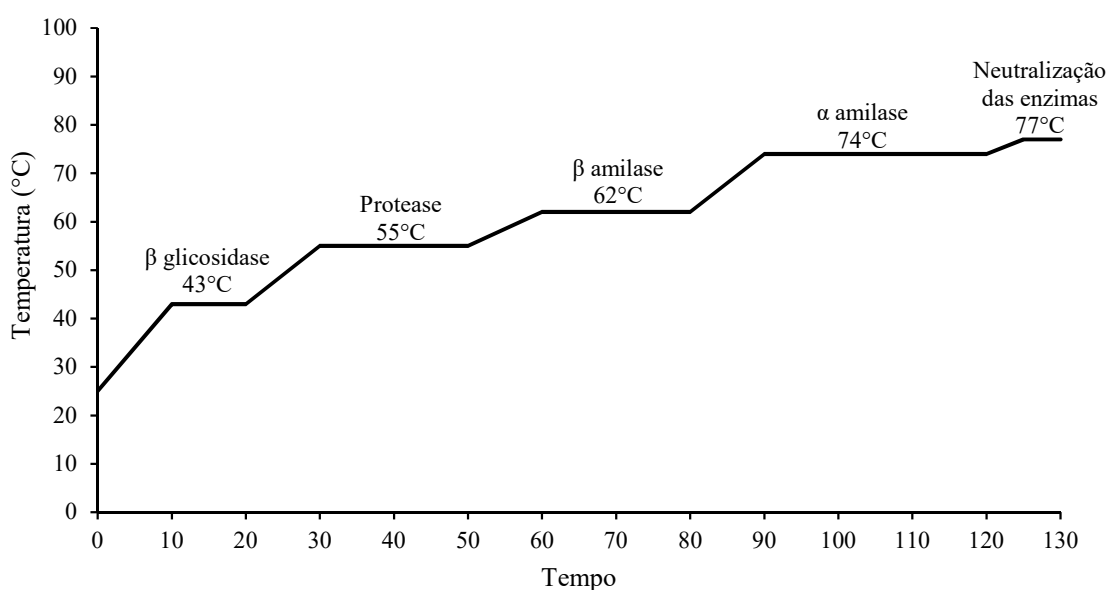
Tabela 1 - Matéria prima utilizada na fabricação de dois lotes de cervejas artesanais

Matéria prima	Lote 1 (L-1)	Lote 2 (L-2)
Água potável	30 L	30 L
Malte (cevada)	5 kg	5 kg
Lúpulo aromático	90 g	90 g
Fermento cervejeiro	60 %	-
<i>Saccharomyces boulardii</i>	40 %	100 %
Açúcar invertido (após a fermentação)	8 g L ⁻¹	8 g L ⁻¹

Fonte: do Autor (2016).

Na produção das cervejas encheu-se a máquina com 25 litros de água. Ligou-se a máquina e programou-se as temperaturas de acordo com os patamares de temperatura ótimos para a ação das enzimas (PALMER, 2006), conforme o gráfico de patamares de temperatura apresentado na Figura 3.

Figura 3 – Patamares de temperatura para ação das enzimas na quebra de açúcares durante a produção das cervejas.



Fonte: do Autor (2016).

Inicialmente a água foi aquecida lentamente e, triturou-se os maltes em um moinho. Para a brassagem foram adicionados na água 5 kg de malte de cevada moídos. Uniformizou-se a mistura. Encaixou-se o filtro e fixou-se a alça. Ligou-se a bomba de circulação, e a temperatura de 43°C (primeiro patamar) da mostura foi alcançada com auxílio da resistência elétrica.

Durante a brassagem, a temperatura foi aumentada e mantida seguindo o programado no início do processo, conforme descreve o gráfico já apresentado na Figura 3. A cada 10

minutos, desligou-se o motor e deixou-se o malte assentar, então ligou-se novamente para que a água voltasse a circular em outros pontos do malte, otimizando assim a extração dos açúcares. A Biermatik® tem o sistema automático para desligar e religar a bomba.

Ao final da brassagem, retirou-se o malte, mas mantêve-se a temperatura de 77 °C para o processo de lavagem do substrato. Desse modo, evitou-se a migração de substâncias indesejáveis – taninos e polifenóis que geram um sabor adstringente – para o líquido, obtendo-se maior eficiência na lavagem. Com auxílio de uma jarra de vidro retirou-se o líquido e lavou-se o malte preso entre os filtros da máquina.

O líquido que ficou no recipiente da máquina foi aquecido a temperatura média de 92 °C e assim permaneceu por uma hora. Durante este período, adicionou-se 90 g de lúpulo aromático.

Após o processo de fervura do mosto, fez-se movimentos centrífugos para decantação dos sedimentos. Então resfriou-se o mosto rapidamente com serpentina, a fim de evitar contaminação por microorganismos e formação de dimetil sulfeto (o qual apresenta um aroma associado a milho verde, legumes cozidos e a frutos do mar). Em seguida, transferiu-se a cerveja artesanal para o tanque de fermentação.

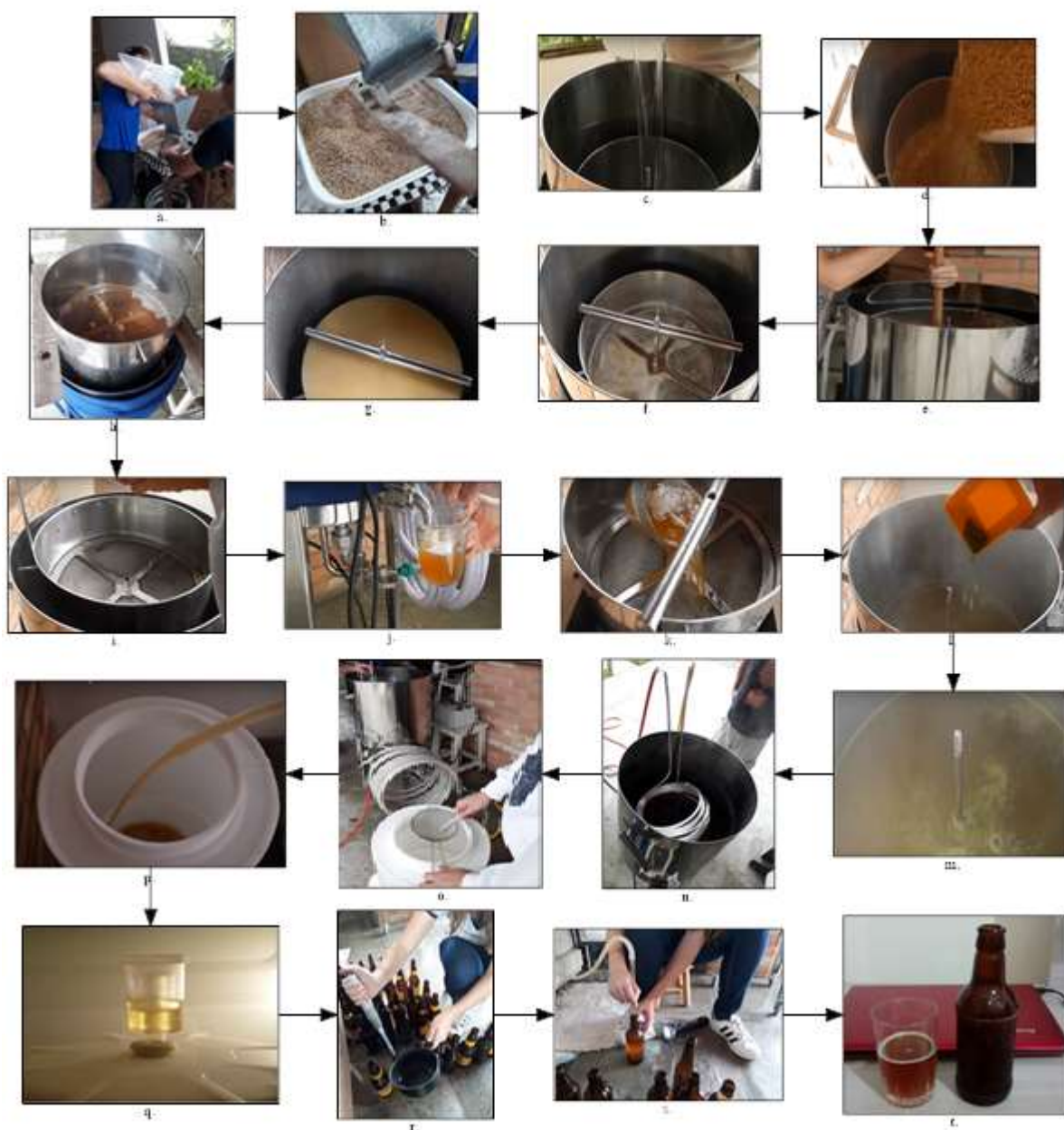
Com o tanque de fermentação completado com cerca de 20 L, misturou-se o fermento cervejeiro liofilizado e *S. boulardii* liofilizada; não foi feito o cálculo de inóculo. Colocou-se a tampa no recipiente e deixou-se em repouso fermentando em geladeira com controlador de temperatura ajustado para 18 °C, durante 10 dias em local com baixa luminosidade.

Após o período de fermentação, a cerveja foi mantida no tanque de fermentação por mais dez dias, a temperatura de 0 °C, sendo esta etapa chamada de maturação. Terminada a maturação, foi adicionado nas garrafas âmbar um *primming* (glicose 8 g L⁻¹), para que ocorresse uma segunda fermentação da cerveja na garrafa. As garrafas foram posicionadas em pé e preencheu-se até o início da curva do gargalo com o auxílio de uma mangueira, com um dispositivo na ponta que só libera a passagem do líquido quando apoiado no fundo da garrafa, o que é essencial para não haver contato com o ar (oxidação) quando a cerveja é envasada.

Para a refermentação, as garrafas foram armazenadas de pé em pequeno cômodo com pouca luminosidade, em temperatura ambiente durante 10 dias. Após este prazo, as cervejas foram separadas em dois grupos, sendo um deles armazenado em temperatura ambiente, enquanto outro foi armazenado em geladeira, e então, foram levados para análise conforme cronograma da análise microbiológica.

As etapas do processo de produção da cerveja artesanal já descritas estão apresentadas em forma de fluxograma na Figura 4.

Figura 4 – Fluxograma das etapas do processo de produção da cerveja artesanal: a. moagem do malte; b. malte moído; c. adição de água; d. adição do malte; e. homogeneização; f. malte e água, liga a bomba; g. movimentação da água com a bomba de agitação e aquecimento ligados; h. cor do mosto após o ciclo de extração dos açúcares; i. retirada do malte após a extração dos açúcares; j. líquido para lavagem do malte; k. lavagem do malte; l. adição do lúpulo; m. fervura; n. resfriamento; o. transferência para o fermentador; p. fermentador; q. formação de bolhas de CO₂, indicador de fermentação; r. adição de primming nas garrafas já higienizadas; s. adição do líquido nas garrafas; t. cerveja pronta.



Fonte: do Autor (2017).

4.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

As amostras das cervejas artesanais produzidas foram avaliadas no laboratório da empresa Levteck Tecnologia Viva Ltda., localizado na cidade de Florianópolis, Santa Catarina. As variáveis analisadas foram: extrato primitivo, extrato real, extrato aparente, teor alcóolico, grau aparente de fermentação, cor e pH.

A determinação laboratorial envolve primeiramente a descarbonatação da cerveja, onde 100 mL da amostra foi transferida para um bequer, vedada com papel alumínio e colocada em um agitador magnético, permanecendo até a descarbonatação da amostra. Em seguida, foi realizada a filtração a vácuo de uma parte da amostra, a qual passou por uma membrana de 0,2µm – esta etapa foi realizada pelo fato da turbidez presente causar erros da leitura. A partir deste ponto, as análises foram realizadas pela leitura direta nos equipamentos específicos.

Para as análises de extrato primitivo, extrato real, extrato aparente, teor alcóolico e grau aparente de fermentação utilizou-se o equipamento Alex 500 (marca Anton Paar GmbH), o qual simultaneamente usa o método NIR (*near-infrared*) para a quantificação de álcool e a densidade da amostra pelo método de oscilação no tubo em U.

O Espectrofotômetro de luz visível (modelo 721G, marca Global Trade Technology) foi utilizado para determinação da cor, por meio da leitura de absorbância da amostra no comprimento de onda de 430 nm. A cor foi expressa em unidade EBC (European Brewery Convention).

O pH das amostras foi medido por leitura direta pelo eletrodo do pHmetro de bancada da marca HANNA, modelo HI-2211.

4.5 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

A análise microbiológica do potencial probiótico da cerveja foi realizada no laboratório da empresa Levteck Tecnologia Viva, localizado na cidade de Florianópolis, Santa Catarina. Esta análise visa a diferenciação das leveduras, bem como da quantificação de *S. boulardii* para avaliação do potencial probiótico da bebida obtida. Para tanto, foram realizadas análises a partir do cultivo das leveduras.

4.5.1 Diferenciação das cepas

Visto que foram utilizadas duas espécies de leveduras na fabricação do L-1, realizou-se alguns testes a fim de verificar a possibilidade de distinguir quais colônias pertenciam à *S. cerevisiae* e à *S. boulardii*, condição essencial para avaliar o potencial probiótico da bebida, que seria dado pela contagem de *S. boulardii*.

Para isso, avaliou-se as características macro (cor, forma, elevação, margem, brilho e textura das colônias) e micromorfológicas, quando crescidas em ágar Tecklev, por 48 horas a 30 °C. A micromorfologia foi analisada por meio da técnica de esfregaço a fresco, na qual retirou-se com uma alça flambada, uma porção do crescimento da levedura e suspendeu-se-a em uma gota de solução solina em uma lâmina, cobriu-se com a lamínula e observou-se ao microscópio sob aumento de 40x.

O meio Tecklev foi desenvolvido para a recuperação de leveduras cervejeiras e leveduras contaminantes do processo, uma vez que, após procedimentos de Clean in Place (CIP), a carga de microrganismos selvagens presentes pode alterar a cor do meio de verde para amarelo devido à produção de ácidos. De acordo com os diferentes padrões de metabolização do corante indicador de pH, leveduras cervejeiras crescerão exibindo colônias de cores diferenciadas de leveduras selvagens. O crescimento de bactérias é inibido no meio Tecklev.

Outro método empregado foi a inoculação das leveduras no meio Tecklev, nas mesmas condições descritas anteriormente, apenas com o diferencial de acidificar o meio com ácido fosfórico 2 M (pH 4,0) visto que vários autores sugerem a resistência ao ácido como uma diferença entre elas, na qual esperava-se obter apenas o crescimento de *S. boulardii*.

4.5.2 Quantificação de UFC de *Saccharomyces boulardii* na cerveja do L-2 para avaliação do potencial probiótico da bebida produzida

Na cerveja do L-2, a qual foi produzida utilizando-se apenas o inóculo de *S. boulardii*, foi realizada a quantificação de células viáveis, com a finalidade de confirmar se a cerveja produzida tem a quantidade mínima de leveduras necessárias para ser considerada um probiótico, ou seja, 10^8 UFC. Para contagem utilizou-se o meio de cultura Tecklev, preparado de acordo com as especificações do fabricante.

Primeiramente, homogeneizou-se a cerveja para que as leveduras ficassem em suspensão e realizou-se a diluição seriada das amostras em série de 10^{-1} até 10^{-4} em solução

salina (0,9 %). Em seguida, 100 μ L de todas as diluições foram plaqueadas em superfície do meio Tecklev, em duplicata, e posteriormente incubadas em estufa a 30°C, sendo o tempo determinado pelo crescimento de levedura no meio de cultura.

Repetiu-se esse procedimento em 15, 30, 45 e 60 dias após o término da fabricação da cerveja, com o propósito de avaliar a vida de prateleira do produto, mantendo o potencial probiótico da cerveja. Essa avaliação foi realizada para a cerveja armazenada em local seco e arejado, ao abrigo de luz, à temperatura ambiente (25 °C) e à temperatura de refrigeração (4 °C).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Com o objetivo de avaliar o potencial da fermentação da *S. boulardii*, a receita e o procedimento para a fabricação de ambas foi a mesma, com exceção da levedura. No L-1 adicionou-se duas leveduras distintas, *S. cerevisiae* pelo seu potencial fermentativo conhecido e *S. boulardii* devido seu potencial efeito probiótico, enquanto no L-2 foi adicionado somente *S. boulardii* como agente fermentativo.

Por consequência, as amostras de cervejas do L-1 e L-2 apresentaram diferenças em todos os parâmetros avaliados (Tabela 2). Isso se deve, naturalmente, às diferenças genéticas, metabólicas e fisiológicas entre as duas cepas de *Saccharomyces*, principalmente quando leva-se em consideração as características cervejeiras das leveduras. A levedura *S. cerevisiae* apresenta floculação – sedimentação ao término da fermentação – média e grau aparente de fermentação – quantidade de açúcar convertida em CO₂ e álcool – alto (73 a 78%); enquanto a *S. boulardii* apresentou, na prática, floculação e grau aparente de fermentação baixos (65 a 70%) (LEVTECK, 2017).

No L-1, com o uso da *S. cerevisiae* junto a *S. boulardii*, ocorreu um maior consumo dos açúcares, o que resultou em um alto grau de fermentação aparente, como resultado do consumo de açúcares, um alta produção de álcool; devido à floculação média de *S. cerevisiae*, o extrato aparente foi mais baixo que em L-2, porém, ainda apresentou-se como uma cerveja encorpada.

Por sua vez, no L-2, a cerveja de *S. boulardii* apresentou grau de fermentação aparente menor que em L-1, por conseguinte, menor teor alcoólico; o extrato aparente foi maior que o apresentado pela cerveja do L-1, visto à baixa floculação de *S. boulardii* e a presença de leveduras em suspensão. Por isso, obteve-se uma cerveja muito encorpada e bem turva, visto à baixa floculação e presença de leveduras.

A respeito da cor e aparência, a maior intensidade de cor tem origem em maltes especiais, utilizados em pequenas frações, proporcionando cores, sabores e aromas singulares com o objetivo de transmitir caracteres para cervejas. No presente trabalho, ainda que a cor tenha apresentado uma grande diferença analítica entre as duas cervejas, ambas são classificadas como cervejas claras.

Tabela 2 – Resultados das análises físico-químicas da cerveja probiótica, tipo Pale Ale, produzida artesanalmente, com mistura de leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* (L-1) e somente *S. boulardii* (L-2); realizadas na empresa Levteck Tecnologia Viva, em Florianópolis, Santa Catarina.

Características	L-1	L-2
Extrato primitivo (%v/v)	12,66	13,10
Extrato real (%v/v)	2,76	5,67
Extrato aparente (%v/v)	3,99	4,68
Grau aparente de fermentação (%)	78,3	69,19
Teor alcoólico (%v/v)	5,32±0,04	4,88±0,06
Cor EBC	10,5	4,3
pH	4,15	4,41

Apesar das diferenças físico-químicas dos L-1 e L-2 ressaltadas anteriormente, a classificação de ambas cervejas foi a mesma, ou seja, quanto ao extrato primitivo em cerveja extra (12 a 14 %), quanto à cor em cerveja clara (<20 unidades EBC), com álcool (>0,5 %), puro malte e de alta fermentação. Todavia, ainda que o teor alcoólico em L-2 (4,88±0,06 %v/v) ficou menor que L-1 (5,32±0,04 %v/v), o ideal seria uma cerveja sem álcool ou com teor alcoólico <2,0 %. Além disso, L-2 foi produzida somente com *S. boulardii* como agente fermentador.

Essa classificação foi dada baseada na IN 54/2001 – MAPA (Brasil, 2001), onde classifica-se as cervejas baseando-se em cinco itens principais: quanto ao extrato primitivo, como leve (5 a 10,5 v/v), cerveja (10,5 a 12 %v/v), extra (12 a 14 %v/v) ou forte (>14 %v/v); quanto a cor, é considerada clara (até 20 unidades EBC) ou escura (>20 unidades EBC); quantidade de álcool presente a classifica como uma cerveja sem álcool (<0,5 %v/v) e com álcool (>0,5 %v/v); quanto a origem do malte em cerveja puro malte (100 % malte de cevada), cerveja (>50% malte de cevada) ou cerveja com nome do grão predominante (<20 % malte de cevada); e quanto a fermentação em cerveja de alta fermentação (levedura na superfície), baixa fermentação (levedura depositam-se no fundo) ou fermentação espontânea (leveduras selvagens presentes no ambiente).

Visto que foi atingido o objetivo e a qualidade da cerveja quando se utiliza só *S. boulardii* é mantida, complementarmente, sugere-se uma melhoria, principalmente em relação aos aspectos físico químicos das cervejas produzidas durante o trabalho: reduzir o teor alcoólico, tendo em vista o grande número de pessoas que apreciam cerveja, e a grande preocupação com o valor energético em prol de uma vida mais saudável, bem como da preservação e viabilidade da levedura probiótica.

5.2 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

5.2.1 Diferenciação das espécies de *Saccharomyces*

Conforme elucidado anteriormente, as leveduras *S. cerevisiae* e *S. boulardii* são similares entre si, no entanto, autores como Fietto et al. (2004) e McFarland (1996) apontam diferenças entre elas: a temperatura ótima de crescimento para a *S. boulardii* é 37 °C e 30 °C para a *S. cerevisiae*. Outra característica da *S. boulardii* é sua resistência em meios ácidos. Além disso, *S. boulardii* não utiliza galactose como fonte de carbono, enquanto a *S. cerevisiae* sim. *S. cerevisiae* é esporogênica e a *S. boulardii* é asporogênica, ainda que seja capaz de produzir híbridos com a *S. cerevisiae*. Por isso, realizou-se as técnicas diferenciação das cepas, no entanto, os resultados foram desfavoráveis e não foi possível diferenciá-las.

As características macromorfológicas analisadas, de ambas leveduras, apresentaram-se iguais (Figura 5): cor cinza esbranquiçado, forma circular, elevação convexa, margem inteira e bem delimitada, sem brilho e textura cremosa. Já a micromorfologia apresentou leveduras pequenas isoladas ou multilaterais, algumas em gemulação com pseudohifas curtas, formato circular ou levemente oval, para ambas espécies de *Saccharomyces*, ainda que a Figura 6 apresente somente *S. boulardii*.

Figura 5 - Características macromorfológicas de *S. cerevisiae* (metade superior) e *S. boulardii* (metade inferior) quando em meio Tecklev, após incubação de 48 horas a 30 °C.

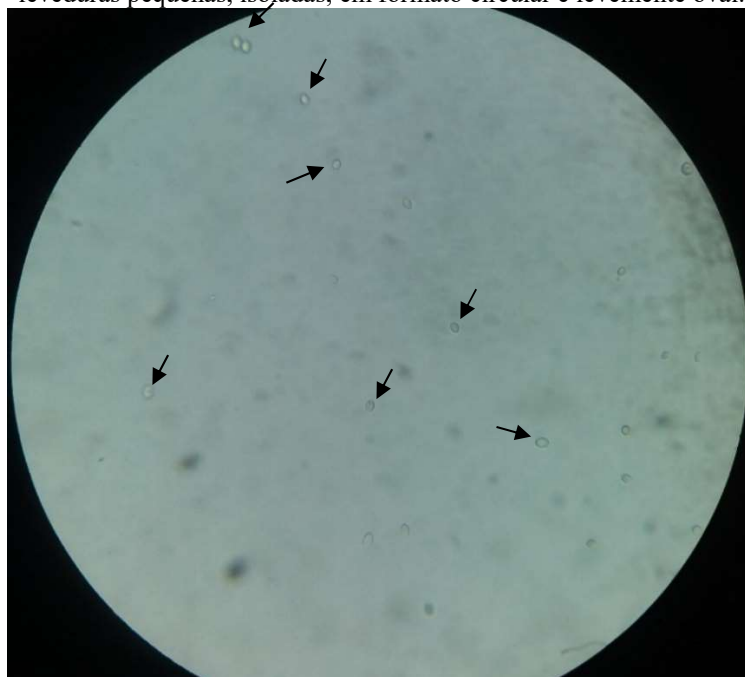


Fonte: do Autor (2017).

Para ser considerado probiótico, o microrganismo deve sobreviver e ser estável frente à acidez estomacal e à bile. Por esta razão, realizou-se o ensaio com adição de ácido fosfórico, avaliou-se apenas o crescimento no meio acidificado, no qual ambas leveduras cresceram no meio de cultura. Isto deve-se, possivelmente, ao pH não ter sido tão baixo quanto o do ambiente

gástrico (pH 2,0), o qual provoca um estresse severo e, na maioria dos casos, letal para a maioria dos microrganismos (FIETTO et al. ,2004).

Figura 6 – Setas fechadas apontam as células leveduriformes da *S. boulardii* ao microscópio sob aumento de 40x. É possível observar leveduras pequenas, isoladas, em formato circular e levemente oval.



Fonte: do Autor (2017).

O principal motivo de utilizar a *S. boulardii* para produção de cerveja em vez da *S. cerevisiae* neste trabalho, é por esta ser um probiótico humano comprovado e usado há décadas, apresentando resultados positivos e seguros em suas aplicações, enquanto *S. cerevisiae* não apresenta a mesma função probiótica em seres humanos.

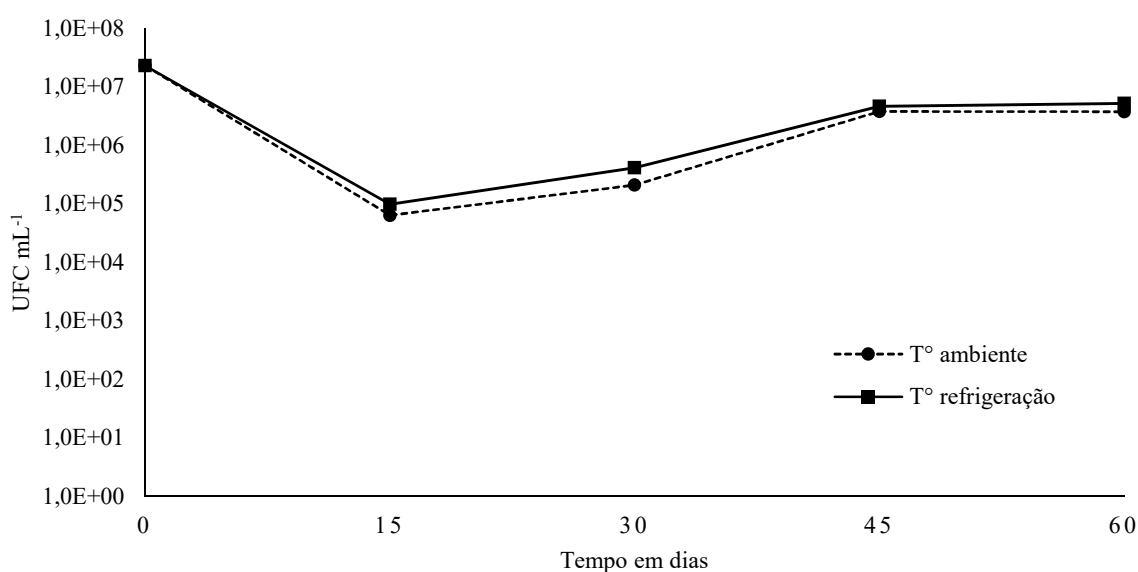
5.2.2 Avaliação do potencial probiótico de *Saccharomyces boulardii* produzida em L-2 pela quantificação de células viáveis

Pelo fato da não possibilidade, pelas técnicas empregadas, de diferenciação entre as leveduras, optou-se por realizar a quantificação de colônias somente na cerveja do L-2, com 100% de *S. boulardii*.

Para a análise microbiológica do potencial probiótico da cerveja, inicialmente quantificou-se o número de colônias presentes no L-2 da cerveja em 15, 30, 45 e 60 dias após o término da fabricação da cerveja, para ambos os grupos de cervejas armazenadas em temperatura ambiente e refrigeração (Figura 8).

Através da diluição seriada, primeiramente, obteve-se os resultados da contagem de *S. boulardii* em UFC mL⁻¹, com aumento das contagens até o 45º dia e estabilização da população após esse período (Figura 8). Quando considera-se apenas 1 mL da bebida produzida, a carga de levedura presente é inferior ao estipulado pela ANVISA para ser considerada uma bebida probiótica.

Figura 7 - Número de UFC mL⁻¹ de *S. boulardii* presentes no L-2 de cerveja, armazenadas em temperatura ambiente (T° ambiente) e refrigeração (T° refrigeração), no decorrer de 60 dias após o término da fabricação da cerveja (refermentação), sendo o ponto zero o inóculo na fermentação.



Fonte: do Autor (2017).

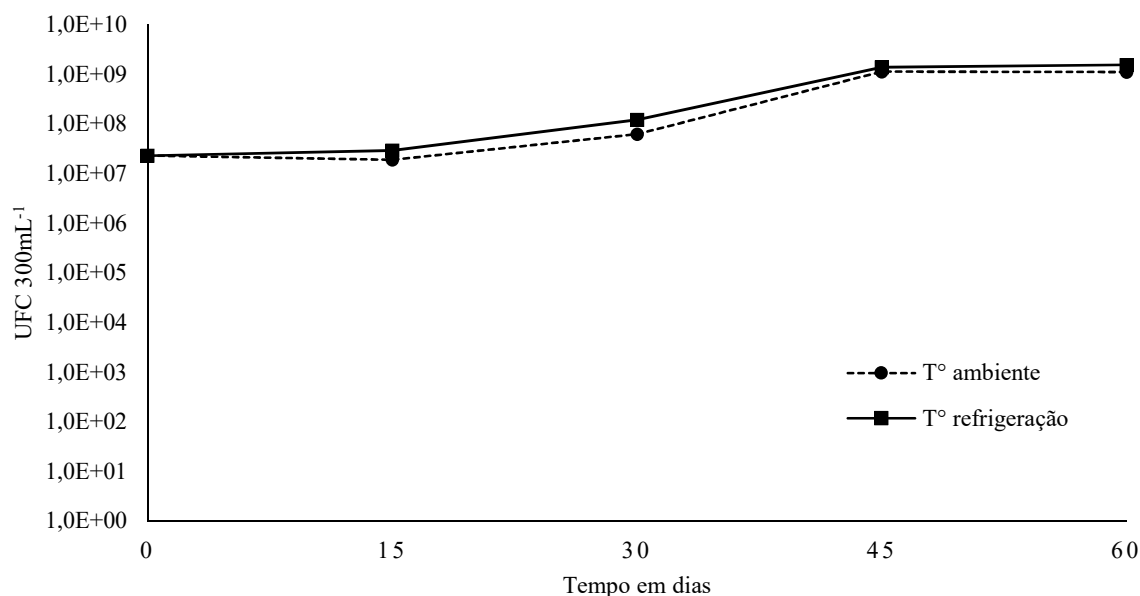
No entanto, ressalta-se que uma dose diária de cerveja corresponde a uma lata ou garrafa pequena (300 mL) de cerveja (RIQUE; SOARES; MEIRELES; 2002). Desse modo, multiplicou-se os resultados obtidos por 300, para obter os resultados referentes a uma dose, indicada para consumo diário de cerveja bem como de probiótico. Logo, os resultados foram ajustados para UFC 300mL⁻¹ (Figura 9).

Tendo em mente que o propósito dessas análises é avaliar e confirmar se a cerveja produzida tem a quantidade mínima de leveduras necessárias para ser considerada um probiótico – mínimo de 10⁸ a 10⁹ UFC dia⁻¹, segundo a ANVISA (2008) – que pode-se, face ao que foi exposto, validar a cerveja produzida como probiótica.

Outro atributo que pode ser analisado a partir dos resultados obtidos é a vida de prateleira da cerveja, mantendo a sua característica probiótica. A qual, conforme os resultados

apresentados, demonstra contagens de *S. boulardii* $>10^8$ UFC 300 mL⁻¹, mesmo 60 dias após o término do processo de fabricação (fermentação em garrafa).

Figura 8 - Número de UFC 300 mL⁻¹ de *S. boulardii* presentes no L-2 de cerveja, armazenadas em temperatura ambiente (T° ambiente) e refrigeração (T° refrigeração), no decorrer de 60 dias após o término da fabricação da cerveja (refermentação), sendo o ponto zero o inóculo na fermentação



Fonte: do Autor (2017).

Há que se apontar também, para o fato que houve um aumento na contagem de leveduras tanto na cerveja armazenada a temperatura ambiente quanto na cervja refrigerada até os 45 dias de armazenamento, após esse período ocorreu a estabilização no número de células leveduriformes, em ambas as amostras.

Essa característica devem-se ao fato que, devido ao baixo grau de fermentação de *S. boulardii* durante a fermentação, na cerveja pronta, ainda resta uma concentração de açúcar, substrato suficiente para o contínuo crescimento celular e manutenção da vida da levedura. Posteriormente, conforme diminui a disponibilidade de nutriente, decresce o número de células.

No trabalho, não foi possível mensurar quanto tempo dura a fase estacionária e após quanto tempo começa a fase de declínio, a fim de determinar a vida de prateleira da cerveja, tendo como ponto central, sua função probiótica. Sugere-se então, para o próximo trabalho, realizar análises em um período maior de tempo, levando também em consideração a manutenção das características organolépticas do produto. Também sugere-se melhoria quanto

ao cálculo de inóculo, a fim de obter *S.boulardii* $>10^8$ UFC 300 mL⁻¹ logo após o término da fabricação da cerveja (refermentação).

A partir dos obtidos resultados pode-se afirmar que *S. boulardii* foi efetiva no processo fermentativo para produção de uma cerveja tipo *Pale Ale* e, pela contagem de células viáveis após a produção da cerveja, que a mesma possui potencial probiótico. Além disso, pela contagem de células viáveis manter-se estável a temperatura ambiente, não é necessário manter a cerveja em temperatura refrigerada desde o início, valendo-se do frio como biostático, o que facilita a sua distribuição e comercialização sem perda de funcionalidade.

Não foram analisados os efeitos causados pela ingestão moderada da cerveja probiótica no organismo do consumidor. No entanto, com base no que foi exposto das características benéficas dos probióticos, bem como do consumo moderado e apreciado da cerveja pela população, a produção de uma cerveja probiótica é uma tecnologia inovadora, podendo tornar-se uma alternativa benéfica para a saúde humana.

Visto que o tema de desenvolvimento de novos produtos probióticos e a busca por alimentos mais saudáveis é de grande relevância, sugere-se mais pesquisas relacionadas à produção de cerveja probiótica e futuramente, sua comercialização; bem como, efeitos no organismo de quem consome a cerveja probiótica regularmente e com moderação; e ainda, a busca de outras leveduras com potencial probiótico.

6 CONCLUSÃO

Foi possível utilizar *Saccharomyces boulardii* na produção de cerveja, como fermentador e agente probiótico de uma bebida funcional, obtendo-se uma bebida de qualidade e probiótica.

Foram produzidas duas cervejas tipo *Pale Ale*, uma com mistura de *S. cerevisiae* e *S. boulardii* e outra somente com *S. boulardii* como agente fermentador.

Não foi possível diferenciar *S. boulardii* de *S. cerevisiae* após o processo de produção de cerveja probiótica, pelas técnicas empregadas, uma vez que as leveduras não apresentam diferenças micro e macroformológicas perceptíveis, nem mesmo seleção a partir do cultivo em meio acidificado, descrito como possibilidade na literatura consultada.

A validação da qualidade das cervejas foi realizada através de análises físico químicas, nas quais ainda foi possível classificá-las como cervejas extra, de cor clara, com álcool >5 %v/v, puro malte e de alta fermentação.

Pode-se concluir ainda que a cerveja produzida com *S. boulardii* pode ser classificada como produto probiótico, visto que contém $>10^8$ UFC 300 mL⁻¹, quantificação de células viáveis superior ao mínimo estipulado pela ANVISA (1×10^8 UFC dia⁻¹). Para a cerveja com mistura *S. boulardii* e *S. cerevisiae* não foi possível fazer a mesma afirmação, visto que não foi possível diferenciar as leveduras nas análises realizadas.

REFERÊNCIAS

- AMERICAN HEART ASSOCIATION – AHA. Science Advisory. **Wine and your heart**. A science advisory for healthcare professionals from the nutrition committee, council on cardiovascular nursing of The American Heart Association. *Circulation*, n. 103; v.3; p. 472-475, 2001.
- ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. 2008. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 24 mar. 2017
- ANVISA. Resolução - CNNPA nº 12, de 1978. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78_malte.htm>. Acesso em: 22 maio 2014.
- ARAUJO, R. L. W. **Mercado de Cerveja no Brasil: Um Estudo Econométrico**. Dissertação. 2001. 47 f. Dissertação (Mestre em Economia) – Fundação Getúlio Vargas, Rio de Janeiro, 2001.
- ARVANITOYANNIS, I.S.; HOUWELINGENKOUKALIAROGLOU, M.V. Functional foods: a survey of health, claims, pros and cons, and current legislation. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.45, p. 385-404, 2005.
- BEDANI, R.; ROSSI, E. A. Microbiota intestinal e probióticos: Implicações sobre o câncer de cólon. **Jornal Português de Gastreenterologia**, v. 16, pp. 19-28, 2009.
- BEHRENS, J.H.; ROIG, S.M.; SILVA, M.A.A.P. Fermentation of soymilk by commercial lactic cultures: development of a product with market potential. **Acta Aliment.**, v.33, p.101-109, 2004.
- BLACK, Jacquelyn G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- BLEICHNER, G. et al. *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. **Journal Intensive Care Medicine**. v.23, n.5, pp. 517-523, maio, 1997. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9201523>> Acesso em: 16 abr. 2014.
- BOBAK, M.; SKODOVA, Z.; MARMOT, M. Effect of beer drinking on risk of myocardial infarction: population based case-control study. **Br. Med. J.**, v. 20, p. 1378-1379, 2000.

BODDY, A. V.; ELMER, G. W.; MCFARLAND, L. V.; LEVY, R. H. Influence of antibiotics on the recovery and kinetics of *Saccharomyces boulardii* in rats. **Pharm. Res.**, v. 8, p.796-800, 1991.

BRASIL, Instrução Normativa nº54 de 05 de novembro de 2001. **Regulamento técnico mercosul de produtos de cervejaria**. Disponível em: < <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/servlet/VisualizarAnexo?id=2272> >. Acesso em: 25 nov. 2017.

BRIGGS, Dennis E. et al. **Brewing: Science and practice**. Inglaterra: Woodhead Publishing Limited, 2011.

CASSONE, Marco et al. Outbreak of *Saccharomyces cerevisiae* Subtype *boulardii* Fungemia in Patients Neighboring Those Treated with a Probiotic Preparation of the Organism. **Journal of clinical microbiology**. American Society for Microbioly. v. 41, pp. 5340-5343, 2003.

CERVBRASIL. Associação Brasileira da Indústria da Cerveja. **Anuário 2014**. p. 35.

CHAMPAGNE, C.P.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.45, p.61-84, 2005.

D. JUNIOR, Amaro A.; VIERA, Antonia G.; FERREIRA, Taciano P. Processo de Produção de Cerveja. **Revista Processos Químicos**, pp. 61-71, jul-dez, 2009.

DE ANDRADE, A. G.; DE OLIVEIRA, L. G. **Principais consequências em longo prazo relacionados ao consumo moderado de álcool**. p. 37-66, 2009.

DE ÁVILA, Fernando Antonio; RIGOBELLO, Everlon Cid; MALUTA, Renato Pariz. **Antibióticos, quimioterápicos e probiótico**. Jaboticabal: Funep, 2011.

DE OLIVEIRA, M. N. et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, jan-mar., 2002.

ELMER, G; MCFARLAND, L. V.; MCFARLAND, M. **The power of probiotics: improving your health with beneficial microbes**. New York, USA. THE HAWORTH PRESS, Inc. 2007.

EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE. Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. **Br. J. Nutr.**, v.81, n.4, suppl.1, p.S1-S27, 1999.

FERRARI, V. **O mercado de cervejas no Brasil**. Dissertação (Mestre em Economia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

FERREIRA, Sandra Cristina da Silva. **Colite pseudomembranosa associada aos antibacterianos**. Dissertação. 2013. 88 f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa. Porto, 2013.

FIETTO, Juliana L.R. et al. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. **Can. J. Microbiol.** v. 50, p 615–621, 2004.

FLORATITUDE. *Saccharomyces boulardii* - Princípio ativo. 2014. Disponível em: < http://www.floratitude.com.br/saccharomyces_principio_ativo.html>. Acesso em: 21 abr. 2014.

FREITAS, G. L. et al. Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH. **Alim. Nutr.**, v. 17, n. 3, pp. 303-307, 2000.

GHISELLI, A. et al. Beer increases plasma antioxidante capacity in humans. **J. Nutr. Biochem.**, v. 11, pp. 76-80, 2000.

GUSLANDI, M. et al. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. **Dig. Disc. Sci.**, v. 45, pp. 1462-1464, 2000.

GUSLANDI, Mario; GIOLLO, Patrizia; TESTONI, Pier Alberto. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**. v. 15, n. 6, pp. 697-698, jun. 2003.

HARDWICK, W. A. **Handbook of brewing**. New York: Marcel Dekker, 1995. 714p.

HENNEQUIN, C. et al. Possible Role of Catheters in *Saccharomyces boulardii* Fungemia. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. v.19, n.1, pp. 16-20, fev. 2000.

INGRAHAM, John L.; INGRAHAM, Catherine A. **Introdução à microbiologia: uma abordagem baseada em estudos de casos**. 3. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

INSTITUT ROSSEL LALLEMAND. Probiotics. Disponível em: <
<http://www.institut-rosell-lallemand.com/page.php?idPage=26&idCatMere=-3&idLangue=2>> Acesso em: 15 abr. 2014a.

INSTITUT ROSSEL LALLEMAND. *Saccharomyces boulardii*. Disponível em:
 < <http://www.institut-rosell-lallemand.com/page.php?idPage=60&idCatMere=32&idLangue=2>> Acesso em:
 15 abr. 2014b.

KALNIN, J. L. **Avaliação estratégica para implantação de pequenas cervejarias**. 1999. 124f. Tese (Doutorado em Engenharia de produção) - Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1999.

KOMATSU, Tiemy Rosana; BURITI, Flávia Carolina Alonso; SAAD, Susana Marta Isay. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.3, p.329-347, 2008.

KOVACS, D. J.; BERK, T. Recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea and colitis treated with *Saccharomyces cerevisiae* (baker's yeast) in combination with antibiotic therapy: a case report. **J. Am. Board Farm. Pract.**, v. 13, p. 138-140, 2000.

LARANJEIRA, Ronaldo et al. **I Levantamento nacional sobre os padrões de consumo de álcool na população brasileira**. Presidência da República. Gabinete de Segurança Institucional. Secretaria Nacional Antidrogas. Brasília - DF, 2007. Disponível em:
 <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/relatorio_padroes_consumo_alcool.pdf>. Acesso em: 04 maio 2014.

LEVTECK, Levteck Tecnologia Viva LTDA ME. Disponível em <
<http://www.levteck.com.br/leveduras-para-cerveja>>. Acesso em: 20 maio, 2017.

LIONG, Min-Tze. Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects. **Springer Science & Business Media**, 2011.

LUKASZEWICZ, Marcin. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: Probiotic Yeast. In: Probiotics. Publisher: RIGOBELLO, Everlon Cid. Universidade de Wrocław. Wrocław, Poland. In Tech, 2012. p. 385-397.

MADIGAN, Michael T. et al. **Microbiologia de Brock**. 12 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MARTINS, F. S. et al. Estudo do potencial probiótico de linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes in vitro. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, 2005b.

MARTINS, F. S. et al. Utilização de leveduras como probióticos. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, p. 14-20, 2005a.

MASSAMBANI, Oswaldo et al. **Coletânea de respostas técnicas**: Produzidas e veiculadas no âmbito do Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas - SBRT. 02. Alimentos e Bebidas. São Paulo: Agência USP de Inovação, 2009.

McFARLAND, L. V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*'. A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent. **Microbial Ecology in Health and Disease**. v. 6, n. 4, pp. 157-171, 1993.

McFARLAND, Lynne V. et al. A Randomized Placebo-Controlled Trial of *Saccharomyces boulardii* in Combination With Standard Antibiotics for *Clostridium difficile* Disease. **Journal of the American Medical Association**. v. 271, n. 24, jun. 1994.

McFARLAND, Lynne V. et al. Prevention of β -Lactam-Associated Diarrhea by *Saccharomyces boulardii* Compared with Placebo. **American Journal of Gastroenterology**. v.90, n.3, p.439-448, mar. 1995.

McFARLAND, Lynne V. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. **Clinical Infectious Diseases**. The University of Chicago, 1996. v. 22, p. 200-201.

MIGOWSKI, E.; PUGLIESE, B. S. Gastreenterite aguda: por que dose maior de *Saccharomyces boulardii* na fase aguda? **Revista Brasileira Clínica Médica**, pp. 267-271, 2009.

MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAIDU, A.S., CLEMENS, R.A. Probiotics. In: NAIDU, A.S. Natural food antimicrobial systems. Boca Raton: CRC, 2000. p.431-462.

OMG, Organização Mundial De Gastroenterologia. **Guias práticos**: Probióticos e Prebióticos. 2008.

PALMER, John J. **How to Brew**: Everything you need to know to brew beer right the first time. Brewers Publications; 3. ed. 2006

RIQUE, A. B. R.; SOARES, E. A.; MEIRELLES, C. M. Nutrição e exercício na prevenção e controle das doenças cardiovasculares. **Rev. Bras. Med. Esporte.** V. 8, n. 6, 2002.

ROSA, S. E. S.; COSENZA, J. P.; LEÃO, L. T. S. Panorama do setor de bebidas no Brasil. **BNDES Setorial**, n. 23, p. 101-150, 2006.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **J. Appl. Microbiol.**, v.98, p.1410-1417, 2005.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, v. 4, n. 1, 2011.

SIQUEIRA, Priscila Becker; BOLINI, Helena Maria André; MACEDO Gabriela Alves. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Jornal Brasileiro de Alimentos e Nutrição Araraquara**. Unesp. v.19, n.4, p. 491-498, out.-dez. 2008.

SMART, Katherine. **Brewing yeast fermentation performance**. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing, 2003.

SOUZA, Anderson Proust Gonçalves. **Caracterização bioquímico-molecular de cepas de *Saccharomyces cerevisiae* isoladas e selecionadas para a produção de cachaça com ênfase na produção de compostos aromatizantes**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Ouro Preto. 2010.

THYGESEN, Julie Bjerre; GLERUP, Henning; TARP, Britta. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probioticum. **BMJ Case Reports**. 2012.

TRABULSI, Luiz Rachid; ALTERTHUM, Flávio. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de cerveja**. Jaboticabal: FUNEP, 2000. 83p.

WHITE, C.; ZAINASHEFF, J. **Yeast: The practical guide to beer fermentation**. 1a ed. Colorado: Brewers Publications, 2010.