

**Caracterização Físico-química de Cerveja
produzida em uma Micro Cervejaria da Região
de Guarapuava - PR**

Guarapuava

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO-OESTE

**Caracterização Físico-química de Cerveja
produzida em uma Micro Cervejaria da Região
de Guarapuava - PR**

Dissertação de Mestrado

Rafael Francisco Kutkoski

Guarapuava

2018

RAFAEL FRANCISCO KUTKOSKI

Caracterização Físico-química de Cerveja produzida em uma Micro Cervejaria da Região de Guarapuava - PR

Dissertação apresentada sob orientação da profa. Dra. Maria Lurdes Felsner, e sob co-orientação do prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Química, pelo Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada, na Universidade Estadual do Centro-Oeste

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lurdes Felsner

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Roberto da Rosa

Guarapuava

2018

*Dedico este trabalho a Deus, que
iluminou meu caminho durante esse
percurso.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, que apesar de todas as dificuldades continuaram me apoiando durante toda essa jornada, principalmente minha mãe Fátima, e minha tia Lurdes.

À minha orientadora Maria Lurdes Felsner, pela oportunidade, paciência, motivação e por todo o conhecimento transmitido, tanto neste trabalho quanto nas disciplinas realizadas.

Ao meu co-orientador Marcos R. da Rosa, que intelectualizou o projeto. Agradeço pelo companheirismo, credibilidade e colaboração em minha formação.

À micro cervejaria e toda sua equipe, pelo apoio financeiro do projeto e colaboração no período de coleta das amostras.

Ao meu grande amigo João P. Niemes e família, pelo incentivo do meu retorno aos estudos e auxílio durante a realização do trabalho.

À família Furlanetto, que esteve o tempo todo acompanhando e incentivando meus estudos.

À minha namorada Josete S. Holocheski, pela paciência, carinho e apoio sincero nos momentos de dificuldade.

À Liziera da Costa Cabrera, que foi fundamental para realização da parte cromatográfica desse trabalho. Agradeço também pelo laço de amizade criado. À Rossana G. V. Marcano, técnica do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, pela colaboração nos ensaios cromatográficos.

Aos Amigos Chalder Nunes e Mariane Butik, pela colaboração e auxílio em algumas medidas.

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao programa de Pós-graduação em Química Aplicada da Unicentro, aos laboratórios TECNORG, LABGATI e Nanotecnologia Farmacêutica, pela estrutura cedida para realização do trabalho.

À todas as pessoas que diretamente e indiretamente, contribuíram na construção desse trabalho.

“ Nem todos os químicos são maus. Sem produtos como o hidrogénio e o oxigénio, por exemplo, não teríamos água, um ingrediente vital para a cerveja. ”

(Dave Barry)

RESUMO

Este trabalho apresenta uma caracterização físico-química de cervejas produzidas em uma micro cervejaria da região de Guarapuava – PR, com a finalidade de contribuir para a padronização do processo produtivo e para o controle de qualidade da bebida produzida por meio de análises físico-químicas tais como pH, acidez, amargor, cor e grau alcoólico e teor de 5-hidroxi-2-metilfurfuraldeído (HMF) realizados em amostras coletadas ao final das etapas principais de produção (brassagem, fervura, fermentação e maturação) e analisados estatisticamente. Além disso, foi realizado também um estudo de validação do método de CLAE-UV e quantificação do composto HMF nas amostras de cerveja lager. Os resultados obtidos com a aplicação de cálculos estatísticos indicam diferenças significativas em todas as etapas de processo de produção de cerveja nas nove amostras coletadas. Os fatores que influenciaram essa diferença foram a alcalinidade da água utilizada na fabricação, mudanças de lote de matéria prima e alterações de formulação. A avaliação dos parâmetros na etapa da maturação (cerveja pronta) mostra uma qualidade físico-química adequada segundo padrões citados na literatura para o estilo de cerveja lager. Para a validação da determinação de HMF, os resultados indicaram valores adequados de precisão (RSD para repetitividade e precisão intermediária de 1,39% e 8,58%, respectivamente) e exatidão (taxas de recuperação entre 96 – 110%) de acordo com recomendações da literatura. Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) de 0,112 e 0,372 mg L⁻¹, respectivamente, foram baixos, demonstrando a sensibilidade do método de CLAE-UV para determinação deste contaminante. Foi observado também uma boa linearidade na faixa de concentrações de 0,5 a 8,0 mg L⁻¹, com valores de $F_{regressão} = 13154,45 > F_{crítico} = 6,55$ e sem falta de ajuste do modelo linear ($(F_{faj} = 2,21 < F_{crítico} = 5,08; p > 0,05)$). Além disso, a comparação dos cromatogramas do padrão de HMF e das amostras indica que o método apresenta uma boa seletividade. Portanto, o estudo de validação realizado neste trabalho indicou que a metodologia cromatográfica foi adequada para a quantificação do HMF em cerveja.

Palavras-chave: Controle de qualidade, análises físico-químicas, HMF, CLAE-UV, validação de métodos, análises estatísticas, cerveja, micro cervejaria.

ABSTRACT

This work presents a physicochemical characterization of beers produced in a micro brewery in the region of Guarapuava – PR, with the purpose to contribute to the standardization of the productive process and the quality control of the beverage produced, with physicochemical analysis such as pH, acidity, bitterness, color, alcoholic content and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) content, realized in samples collected at the end of the main stages of the production (mashing, boiling, fermentation, maturation) statistically analyzed. In addition, a validation study of the HPLC-UV method and quantification of the HMF compound in the lager beer samples was also performed. The results obtained with the application of statistical calculations indicate significant differences in all stages of the beer production process in the nine samples collected. The factors that influenced this difference were the alkalinity of the water utilized in the production, changes in the raw material lot and changes in the formulation. The evaluation of the parameters in the stage of maturation (finished beer) shows an adequate physicochemical quality according to standards cited in the literature for the style of lager beer. For the validation of HMF determination, the results indicated adequate precision values (RSD for repeatability and intermediate precision of 1.39% and 8.58%, respectively) and accuracy (recovery rates between 96 - 110%) according to literature recommendations. The limits of detection (LD) and quantification (LQ) of 0.112 and 0.372 mg L⁻¹, respectively, were low, demonstrating the sensitivity of the HPLC-UV method for determination of this contaminant. A good linearity was also observed in the concentration range of 0.5 to 8.0 mg L⁻¹, with $F_{regression}$ values = 13154.45 > $F_{critic} = 6.55$ and without adjustment of the linear model ($(F_{faj} = 2.21 < F_{critic} = 5.08; p > 0.05)$). In addition, comparison of HMF standard chromatograms and sample chromatograms indicates that the method shows good selectivity. Therefore, the validation study performed in this work indicated that the chromatographic methodology was adequate for the quantification of HMF in beer.

Key words: Quality control, physicochemical analysis, HMF, HPLC-UV, validation of methods, statistical analysis, beer, micro brewery.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
EPÍGRAFE	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
SUMÁRIO	v
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	.ix
LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xi
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	13
1.1. Introdução	14
1.2. Objetivos	16
1.2.1. Objetivo Geral	16
1.2.2. Objetivos Específicos	16
1.3. Referências	17
CAPÍTULO 2. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE CERVEJA	18
2.1.CERVEJA	19
2.1.1. Definição e Breve Histórico	19
2.1.2. Classificação	20
2.1.2.1. Extrato Primitivo	20
2.1.2.2. Cor	20
2.1.2.3. Teor Alcoólico	20
2.1.2.4. Proporção de Malte	21
2.1.2.5. Fermentação.....	21
2.1.3. Estilos	21
2.1.3.1. Cerveja Lager Estilo Pilsen	22
2.2. Matéria Prima para Fabricação de Cerveja	22
2.2.1. Água	22
2.2.2. Malte	23
2.2.3. Lúpulo	26
2.2.4. Levedura	29
2.3. Processamento	30
2.3.1. Brassagem	31
2.3.2. Fervura.....	32
2.3.3. Fermentação	33
2.3.4. Maturação	34
2.4. Controle de Qualidade	35
2.4.1. pH	36
2.4.2. Amargor	36
2.4.3. Cor	37
2.4.4. Acidez	38
2.4.5. Teor Alcoólico	38
2.4.6. Hidroxi-metil furfural (HMF)	39
2.5. Referências	41
CAPÍTULO 3. AMOSTRAGEM	46
3.1. Amostras de Cerveja	47

3.2. Cerveja produzida na Micro Cervejaria avaliada	49
3.3. Referências	51
CAPÍTULO 4. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	52
4.1. Materiais e métodos	53
4.1.1. Amostras	54
4.1.2. Determinação de HMF por CLAE-UV	54
4.1.2.1. Reagentes	54
4.1.2.2. Equipamento e Condições de Análise	55
4.1.2.3. Preparo das Soluções das Amostras	55
4.1.2.4. Validação do Método de CLAE-UV para Determinação de HMF em Cerveja	56
4.1.2.4.1. Seletividade	56
4.1.2.4.2. Linearidade	56
4.1.2.4.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	57
4.1.2.4.4. Precisão	57
4.1.2.4.5. Exatidão	58
4.1.2.5. Análise Estatística	58
4.2. Resultados e Discussão	58
4.2.1. Seletividade	59
4.2.2. Linearidade	61
4.2.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	62
4.2.4. Precisão	63
4.2.5. Exatidão	64
4.3. Aplicação do Método Validado de CLAE-UV as Amostras de Cerveja	65
4.4. Conclusões parciais	68
4.5. Referências	69
CAPÍTULO 5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CERVEJA	71
5.1. Materiais e Métodos	72
5.1.1. Determinação de pH	72
5.1.2. Determinação da Acidez Total	72
5.1.3. Álcool em peso a 20° ou Grau Alcoólico	73
5.1.4. Determinação do Amargor da Cerveja	73
5.1.5. Determinação da Cor da Cerveja	74
5.2. Resultados e Discussão	74
5.2.1. Análises Físico-Químicas	74
5.2.2. Influência das etapas de fabricação de cerveja (brassagem, fervura, fermentação e maturação) nos valores de pH	75
5.2.3. Influência das etapas de fabricação (brassagem, fervura, fermentação e maturação) nos valores de acidez	80
5.2.4. Influência das etapas de fabricação (Fervura, Maturação) nos valores de amargor	84
5.2.5. Influência da etapa de maturação na composição físico-química da cerveja	88
5.3. Conclusões parciais	93
5.4. Referências	93
CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES	96
CAPÍTULO 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	98
ANEXO	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Variações de cores de diferentes tipos de maltes de cevada	24
Figura 2.2. Fracionamento das resinas contidos no lúpulo. Adaptado de SAKAMOTO; KONINGS (2003)	26
Figura 2.3. Principais resinas presentes no lúpulo. SAKAMOTO; KONINGS (2003)	27
Figura 2.4. Plantas de lúpulo cultivadas em território brasileiro. (A) Cultivo de lúpulo em Campos do Jordão-SP; (B) Planta de lúpulo em Guarapuava-PR. Adaptado de BREWFEED (2018).....	28
Figura 2.5. Lúpulo comercial em pellets	29
Figura 2.6. Carboidratos metabolizados pela levedura <i>S. cerevisiae</i> . Adaptado de SENAI (2018).....	30
Figura 2.7. Principais etapas da produção de cerveja. Adaptado de ALMEIDA (2011)	30
Figura 2.8. Principais isômeros presentes no lúpulo (trans e cis iso- α -ácidos). (VANHOENACKER; DE KEUKELEIRE e SANDRA, 2004)	37
Figura 2.9. Fórmula estrutural do HMF (WROLSTAD, 2013).	39
Figura 3.1. Fluxograma de coleta das amostras para a quantificação do HMF nos produtos do processo de produção da cerveja de uma Micro Cervejaria	48
Figura 3.2. Fluxograma de coleta para as análises físico-químicas dos produtos do processo de produção da cerveja de uma micro cervejaria	49
Figura 3.3. Cereal maltado utilizado para a produção de cerveja. (A) Grão de malte de cevada. (B) Grão de malte de cevada moído	50
Figura 4.1. Cromatograma da amostra da maturação fortificada com padrão de HMF 2 mg/L	59
Figura 4.2. Curvas analíticas de padrão externo (linha preta) e de adição de padrão na amostra de fervura (linha vermelha) para determinação de HMF	60
Figura 4.3. Curvas analíticas de padrão externo (linha preta) e de adição de padrão na amostra da maturação (linha vermelha) para determinação de HMF	60
Figura 4.4. Gráfico da reta de regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos de predição (IP) a 95% de confiança para a curva de calibração por CLAE-UV	62

Figura 4.5.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos teores de HMF de cerveja <i>lager</i>	66
Figura 4.5.2. Gráfico de efeito de interação dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos teores de HMF de cerveja <i>lager</i>	67
Figura 5.1.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção de cerveja (brassagem (1), fervura (2), fermentação (3) e maturação (4) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de pH de cerveja <i>lager</i>	75
Figura 5.1.2. Gráfico do efeito de interação dos fatores etapas de produção de cerveja (brassagem (1), fervura (2), fermentação (3) e maturação (4)) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de pH de cerveja <i>lager</i>	78
Figura 5.2.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção de cerveja (brassagem, fervura, fermentação e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de acidez de cerveja <i>lager</i>	80
Figura 5.2.2. Gráfico de efeito de interação dos fatores etapas de produção (brassagem (1), fervura (2), fermentação (3) e maturação (4)) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de acidez de cerveja <i>lager</i>	82
Figura 5.3.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de amargor de cerveja <i>lager</i>	86
Figura 5.3.2. Gráfico de efeito de interação dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de amargor de cerveja <i>lager</i>	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Perfil mineral da água de diferentes estilos de cerveja produzidos por cervejarias tradicionais	23
Tabela 2.2. Diferenças entre a composição do grão de cevada e malte pilsen	24
Tabela 2.3. Atuação enzimática e valores ideais de pH e temperatura	31
Tabela 3.1. Informações referentes à amostragem na micro cervejaria	47
Tabela 4.1. Análise de regressão linear no nível de 95 % de confiança	61
Tabela 4.2 Estimativas de repetitividade e de precisão intermediária e valor Horrat para o estudo da precisão	63
Tabela 4.3. Taxas de recuperação (%) de HMF para as etapas de fervura e de maturação	64
Tabela 4.4. Teores médios e respectivos desvios padrão das amostras coletadas nas etapas de fervura e de maturação do processo de produção de cerveja <i>lager</i>	65
Tabela 4.5. Análise de Variância de dois fatores para teor de HMF nas etapas de produção de cerveja <i>lager</i>	65
Tabela 5.1. Classificação de cor da cerveja de acordo com a Analytica-EBC	74
Tabela 5.2. Valores médios de pH das etapas de produção de cerveja na Micro Cervejaria	75
Tabela 5.3. Análise de Variância de dois fatores para influência das etapas de produção de cerveja nos valores de pH	75
Tabela 5.4. Valores médios de acidez (mEq/L) e respectivos desvios padrão das etapas de produção de cerveja na Micro Cervejaria	80
Tabela 5.5. Análise de Variância de dois fatores para acidez (mEq/L) em cerveja <i>lager</i>	81
Tabela 5.6. Valores médios de amargor e respectivos desvios padrão das etapas de produção de cerveja (fervura e maturação) na Micro Cervejaria	84
Tabela 5.7. Análise de Variância de dois fatores para os valores de amargor em cerveja <i>lager</i>	84

Tabela 5.8. Análise físico-química das amostras coletadas na etapa de maturação da produção de cerveja na Micro cervejaria	86
---	----

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção no Ultra-Violeta
EBC	European Brewery Convention
F_{faj}	F para falta de ajuste
F_{obs}	F observado
$F_{regressão}$	F para regressão
g.l.	Graus de liberdade
HMF	5-(hidróximetil)-2-furaldeído ou hidróximetilfurfuraldeído
IC	Intervalo de confiança
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IP	Intervalo de predição
LabGati	Laboratório de Análise de Traços e Instrumentação
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
QM	Quadrado Médio
r	Coeficiente de correlação
R^2	Coeficiente de determinação
RSD	Relative standard deviation (Desvio padrão relativo)
SQ	Soma dos Quadrados
SRM	Standard Reference Method
TECNORG	Grupo de Química Orgânica e Tecnologia

UA Unidades de Amargor

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1.1. Introdução

O controle de qualidade realizado por indústrias cervejeiras vem se destacando em relação às demais indústrias agroalimentares. Contudo, essas empresas apresentam problemas no controle de qualidade e padronização, geralmente por consequência de diferenças encontradas na composição das matérias primas utilizadas na fabricação de seus produtos (DE TOLEDO; BATALHA e AMARAL, 2000).

Na indústria cervejeira, o controle de qualidade e a padronização podem ser realizados por meio de análises cromatográficas com o intuito de identificar e quantificar compostos orgânicos voláteis e não voláteis presentes no mosto e na cerveja (BIAZON, 2008), e através de análises físico-químicas de pH, acidez, grau alcoólico, cor e amargor. Essas análises rotineiras são utilizadas por diversas cervejarias, porém em micro cervejarias que não dispõem de equipamentos sofisticados, geralmente são empregadas a análise sensorial e algumas análises físico-químicas.

Com o aumento da exigência pelo mercado consumidor micro cervejarias têm sido forçadas a aumentarem o rol de análises necessárias para o controle de qualidade dos seus produtos. Para maioria das indústrias de pequeno porte torna-se inviável a aquisição de diversos equipamentos, muitas vezes caros, e que exigem infraestrutura e mão de obra qualificada. Isto mostra a necessidade de uma maior interação das micro cervejarias com os centros de pesquisa e universidades, que possam viabilizar a caracterização adequada de seus produtos. Entre as análises complexas, destaca-se a quantificação de compostos orgânicos prejudiciais à qualidade da cerveja, que usualmente são determinados por cromatografia. Dentre os compostos que prejudicam sensorialmente a cerveja, pode-se citar o HMF.

O composto 5-hidróxi-2-metilfurfuraldeído (HMF) é um contaminante resultante da reação de Maillard e formado a partir do aquecimento durante a etapa de fervura na produção de cerveja. Sua concentração aumenta no período de armazenagem, podendo ser um indicador de envelhecimento de bebidas e alimentos. Diversos estudos sugerem que este composto pode ser tóxico e até mesmo cancerígeno. Além disso, este pode afetar a qualidade sensorial de alimentos e bebidas através de modificações em parâmetros físico-químicos como cor, sabor e aroma (DE ANDRADE et al., 2016; POLICARPO, 2012).

Na literatura são descritas algumas metodologias que fazem uso da cromatografia líquida com detecção UV (CLAE-UV) na determinação de HMF em cerveja, com pré-tratamento da amostra através do emprego de agentes derivatizantes, derivatização combinada com micro extração e pelo acoplamento de detectores de UVIR em série. A aplicação de agentes derivatizantes como a solução ácida de 2,4 dinitrofenilhidrazina em acetonitrila é justificada por ocorrer precipitação de compostos carbonilados presentes na cerveja, desse modo, impossibilitando a injeção direta das amostras na determinação de HMF de acordo com alguns pesquisadores (LO COCO et al., 1995; WU; SHI e FENG, 2009). No entanto, o uso de métodos de preparo de amostra como a derivatização, torna a metodologia analítica mais morosa além de aumentarem o custo final da análise.

Considerando esses fatos, este trabalho investigou a injeção direta das amostras de cerveja pelo método CLAE-UV sem pré-tratamento da amostra. Posteriormente foi realizada a quantificação de HMF nas amostras das etapas de fervura e de maturação da fabricação de cerveja tipo *lager* produzida em uma micro cervejaria situada na região de Guarapuava-PR. Foi realizada também a avaliação através de análises físico-químicas e estatísticas da influência do tipo da matéria prima e das etapas do processo de fabricação da cerveja no controle de qualidade desta bebida.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivos gerais

Caracterizar por meio de análises físico-químicas a produção de cerveja artesanal tipo lager produzida por uma Micro Cervejaria da região de Guarapuava-PR, visando contribuir para a padronização do processo de produção e controle de qualidade.

1.2.2. Objetivos específicos

- Otimizar e validar a determinação de HMF na produção de cerveja nas etapas de fervura e maturação por CLAE-UV utilizando diferentes técnicas estatísticas;
- Realizar análises físico-químicas (pH, acidez, cor, grau alcoólico, HMF e amargor) dos produtos das diferentes etapas do processo (brassagem, fervura, fermentação e maturação) de produção de cervejas produzidas ao longo de quatro meses;
- Aplicar ferramentas estatísticas aos dados das análises físico-químicas visando identificar a influência de mudanças de formulação, de processo e de composição da matéria prima na qualidade da cerveja produzida na micro cervejaria.

1.3. Referências

BIAZON, C. L. **Utilização de adsorventes durante o processo de microextração em fase sólida de flavours de cerveja**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2008.

CASTELLARI, M. et al. Determination of Carboxylic Acids , Carbohydrates , Glycerol , Ethanol , and 5-HMF in Beer by High-Performance Liquid Chromatography and UV – Refractive Index Double Detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 39, p. 235–238, 2001.

DE ANDRADE, J. K. et al. In house validation from direct determination of 5hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Brazilian corn and cane syrups samples by HPLCUV. **Food Chemistry**, v. 190, p. 481–486, 2016.

DE TOLEDO, J. C.; BATALHA, M. O.; AMARAL, D. C. Qualidade na Indústria Agroalimentar: Situação Atual e Perspectivas. **Revista de Administração de Empresas**, v. 40, n. 2, p. 90–101, 2000.

LO COCO, F. et al. Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. **Analytica Chimica Acta**, v. 306, p. 57–64, 1995.

POLICARPO, Â. S. R. **Contaminantes Alimentares Resultantes do Processamento Térmico: Furano e Hidroximetilfurfural**. [s.l.] Universidade de Trás-Montes e Alto Douro, 2012.

WU, J. Y.; SHI, Z. G.; FENG, Y. Q. Determination of 5-hydroxymethylfurfural using derivatization combined with polymer monolith microextraction by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 3981–3988, 2009.

CAPÍTULO 2. REFERENCIAL TEÓRICO

CAPÍTULO 2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Cerveja:

2.1.1. Definição e Breve Histórico

A cerveja é uma bebida produzida a partir da reação de hidrólise do malte para formação do mosto cervejeiro, que recebe adição de lúpulo e posteriormente é fermentado para a obtenção da cerveja (MAPA, 2009). Diversos relatos sugerem que a produção de cerveja teve início na Babilônia por volta de 8000 a.C. (MEGA; NEVES e ANDRADE, 2011). Naquela época a bebida possuía coloração escura, forte e muitas vezes era utilizada como substituta da água, dessa forma, evitava algumas doenças causadas pela presença de contaminantes na água, uma vez que a processo de produção de cerveja, inativa patógenos presentes na água (NASCIMENTO, 2004).

A produção de cerveja começou a destacar-se durante o Império Romano pelos cervejeiros germânicos que, no século XII, inovaram com a introdução do lúpulo como ingrediente, prática esta que é mantida até os dias atuais e confere característica de amargor bem como qualidade à bebida (MEGA; NEVES e ANDRADE, 2011).

As primeiras cervejas produzidas eram feitas seguindo processos artesanais e uma regulamentação para a produção da bebida não existia. A preocupação com a qualidade da cerveja levou à elaboração da primeira lei para regulamentação da produção de cerveja, criada pelo Duque Guilherme VI da Bavária no ano de 1516, chamada de Reinheitsgebot (lei da pureza) que estabeleceu apenas uso dos ingredientes cevada, lúpulo e água na fabricação de cerveja (PERIM; ANDRADE e RHUNA, 2013).

O início da produção de cerveja no Brasil ocorreu em pequenas cervejarias entre os anos de 1830 e 1850. Esse cenário sofreu uma modificação no ano de 1988 com a criação das duas grandes cervejarias Antarctica Paulista e a Manufatura de Cerveja Brahma Villiger e Companhia (MATSUBARA et al., 2006). No mercado Brasileiro, a cerveja tipo pilsen conquistou grande destaque, abrangendo cerca de 98% do consumo total de cervejas atualmente (DA SILVA, 2013; TELES, 2007). A preferência por esse estilo de cerveja, por grande parte dos brasileiros deve-se provavelmente às suas características, tais como, baixo teor alcoólico, corpo leve e sabor delicado que combinam com o clima tropical.

2.1.2. Classificação

A cerveja é classificada de acordo com o decreto número 6871, de 04 de junho de 2009, publicado no Diário Oficial da União, que regulamenta a lei número 8.918, de 14 de julho de 1994, e dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas.

Os parâmetros de classificação utilizados pela legislação brasileira são os seguintes: extrato primitivo, a cor, o teor alcoólico, a proporção de malte e a fermentação. Tais parâmetros estão melhor descritos a seguir.

2.1.2.1. Extrato Primitivo

O extrato primitivo tem relação direta com o teor de substâncias no mosto inicial da cerveja, sendo estas substâncias o malte ou adjuntos. Desta forma, a cerveja pode ser classificada em leve, comum, extra e forte. A cerveja leve, é aquela cujo extrato primitivo apresenta teor entre 5,0 e 10,5% (m/m), ou seja, baixo teor de substâncias presentes no mosto inicial. Para a cerveja comum, o extrato primitivo deve apresentar teores variando entre 10,5 e 12,0% (m/m). A cerveja extra, é toda cerveja cujo extrato primitivo apresenta teores entre 12,0 e 14,0% (m/m). No mesmo sentido, as cervejas consideradas fortes são aquelas cujo extrato primitivo apresenta teor superior a 14,0% (m/m).

2.1.2.2. Cor

Outra classificação das cervejas, diz respeito à sua coloração. Cervejas claras, escuras e coloridas podem ser encontradas. A cerveja clara é aquela que apresenta cor inferior a vinte unidades EBC (European Brewery Convention), unidade utilizada para medição de coloração em cervejas. A cerveja escura é aquela que apresenta cor igual ou superior a vinte unidades EBC. Por outro lado, cervejas coloridas são todas as que, pela ação de corantes naturais acrescentados, apresenta coloração diferente das definidas no padrão EBC.

2.1.2.3. Teor alcoólico

Cervejas são ainda usualmente classificadas quanto ao seu teor alcoólico. São consideradas cervejas sem álcool aquelas cujo conteúdo em álcool é menor ou igual a 0,5% (v/v), não sendo obrigatório declarar o conteúdo alcoólico no rótulo. As demais cervejas, com concentração de álcool superior a 0,5%, são consideradas cervejas com álcool. Para estas, o teor alcoólico deve ser obrigatoriamente declarado no rótulo.

2.1.2.4. Proporção de malte

A cerveja pode ainda ser classificada como puro malte, cerveja e “cerveja de ...”. Cerveja puro malte é aquela produzida com 100% (m/m) de malte sobre o extrato primitivo, ou seja, o malte é a única fonte de açúcares. Por outro lado, “cerveja” é aquela produzida com proporção de malte de cevada igual ou superior a 55,0% (m/m), sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares. As outras fontes de açúcares utilizadas na fabricação da cerveja são provenientes de adjuntos cervejeiros. São classificados com “cerveja de ...”, seguida pelo nome do vegetal prevalecente, como por exemplo a cerveja de trigo, toda cerveja produzida com proporção de malte entre 20,0 e 55,0% (m/m), sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares.

2.1.2.5. Fermentação

As cervejas podem ser classificadas como de baixa fermentação e alta fermentação. A produção de uma cerveja de baixa fermentação utiliza cepas da levedura *Saccharomyces uvarum* no processo fermentativo. Temperaturas aproximadas de 10°C e duração entre 10 a 12 dias são utilizadas para a fermentação destas cervejas, nomeadas como tipo *lager*. Cervejas de alta fermentação, são aquelas que utilizam cepas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no processo fermentativo. Temperaturas aproximadas de 18°C por um período de 3 a 5 dias são utilizadas no processo e dão origem às cervejas tipo *Ale*.

2.1.3. Estilos

Ainda de acordo com o decreto número 6871, citado acima a cerveja poderá ser denominada conforme seu tipo: 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. Estes diferentes estilos de cervejas são obtidos utilizando distintos tipos de malte e em diferentes proporções conferindo características intrínsecas de cada estilo. Os estilos de cervejas citados acima são descritos mais detalhadamente pelo guia BJCP (*Beer Judge Certification Program*), atualizado no ano de 2015 (STRONG; ENGLAND, 2015).

2.1.3.1. Cerveja Lager Estilo Pilsen

A cerveja lager estilo pilsen, objeto de estudo deste trabalho, teve origem na região da Boêmia, atualmente situada na República Tcheca. Apresenta características de coloração amarelo claro a dourada profunda, transparente e com nitidez cristalina, espuma de cor branca, cremosa, densa e duradoura. O Amargor de lúpulo varia de baixo a alto e domina o paladar que permanece no retrogosto. Sendo esse estilo de cerveja, um dos mais consumidos no Brasil.

2.2. Matéria prima

As principais matérias primas utilizadas na produção de cerveja são água, malte, lúpulo e levedura, esses ingredientes possuem variações em sua composição, que originam diversos estilos de cerveja. Além desses ingredientes, muitas indústrias utilizam os chamados adjuntos cervejeiros como substituto parcial do malte (SCHUH e PRECI, 2009).

2.2.1. Água

No processo cervejeiro a água é a principal matéria prima, correspondendo aproximadamente 90 a 95% do peso total da cerveja. Além da água necessária na fabricação, para cada litro de cerveja engarrafada pode ser consumido entre 5 a 20 litros de água em usos diversos, como por exemplo, na higienização dos equipamentos (SCHUH e PRECI, 2014).

Atualmente, a água cervejeira passa por diversos tratamentos físico químicos, afim de alcançar pureza elevada e um perfil mineral semelhante ao local de origem do estilo da cerveja (MEGA; NEVES e ANDRADE, 2011). Os teores de minerais das águas que origina diferentes estilos de cervejas estão relacionados na Tabela 2.1.

Tabela 2.1. Perfil mineral da água de diferentes estilos de cerveja produzidos por cervejarias tradicionais.

Cidade de		Minerais (mg L ⁻¹)					
Origem	Estilo	Ca ⁺²	Mg ⁺²	HCO ₃ ⁻¹	Na ⁺¹	Cl ⁻¹	SO ₄ ⁻²
Pilsen	Pilsner Lager	10	3	3	3	4	4
Dublin	Dry Stout	118	4	319	12	19	54
Dortmund	Export	225	40	180	60	60	120
Vienna	Vienna Lager	200	60	120	8	12	125
Munich	Oktoberfest	76	18	152	?	2	10
London	British Bitter	52	32	104	86	34	32
Edinburgh	Scottish Ale 76	125	25	225	55	65	140
Burton	India Pale Ale	352	24	320	54	16	820

Fonte: Adaptado de (PALMER e KAMINSKI, 2013).

O perfil mineral da água pode ser modificado de acordo com as características do processo de produção das cervejas, por exemplo, a cerveja pilsen, que necessita de uma água com baixo teor de cálcio e magnésio, presentes na forma de sulfatos, cloreto e bicarbonatos (BANDINELLI, 2015). Além disso, a qualidade da água também é afetada pelo pH, sendo desejável valores levemente ácidos para promover atividade enzimática de forma adequada (KUCK, 2008).

2.2.2. Malte

O ministério da agricultura, pecuária e abastecimento (MAPA) considera que malte de cevada é o produto resultante da germinação forçada e controlada, sob condições especiais de umidade e temperatura da cevada do gênero *Hordeum*, e posterior secagem. A Figura 2.1 apresenta os diferentes tipos de malte utilizados na fabricação dos vários estilos de cervejas. A Tabela 2.2, apresenta a relação das diferentes composições da cevada anterior e posterior ao processo de malteação, respectivamente:



Figura 2.1. Variações de cores de diferentes tipos de maltes de cevada (DINSLAKEN, 2017).

Tabela 2.2. Diferenças entre a composição do grão de cevada e malte pilsen.

Características	Cevada	Malte
Massa do Grão (mg)	32-36	29-33
Umidade (%)	10-14	4-6
Amido (%)	55-60	50-55
Açúcares (%)	0,5-1,0	8-10
Nitrogênio Total (%)	1,8-2,3	1,8-2,3
Poder Diastásico °Lintner	10-12	35-50
α amilase, unidades de dextrinas	Traços	100-250
Atividade proteolítica	Traços	15-30

Fonte: adaptado de AQUARONE; LIMA e BORZANI (1983).

O malte usado na fabricação de cervejas geralmente é proveniente da cevada, entretanto também pode ser obtido de outros cereais, tais como milho, aveia, arroz e trigo. Embora estes outros cereais possam ser submetidos ao processo de malteação, maiores dificuldades nesse processo implicam gastos extras, levando às cervejarias utilizá-los apenas como adjunto não maltado, e assim reduzindo o custo em relação à cevada (D'AVILA et al., 2012; EVANGELISTA et al., 2005).

Além da utilização de cereais não maltados como a própria cevada em substituição parcial do malte, o custo de fabricação da cerveja é reduzido pela adição de outras substâncias, tais como xaropes de glicose e açúcares também considerados adjuntos cervejeiros. Entretanto, quando essa adição for superior a 20%, ocorre um acréscimo na

formação de diacetil (2,3-butanodiona), prejudicando as características organolépticas da cerveja, pelo sabor desagradável de manteiga típico deste composto (KUCK, 2008).

O uso de cereais diferentes do malte de cevada, além de diminuir a qualidade sensorial da bebida, resulta em maior dificuldade no processo de malteação devido ao aumento de ataques por microrganismos à superfície do grão, prejudicando também a capacidade de hidrolisar o amido contido na parte interna do grão (poder diastásico) (CAVALCANTE, 2016; CERRI, 2012). A cevada possui diversas vantagens quando comparada com outros grãos, a mesma possui casca insolúvel, que produz uma camada filtrante natural durante o processamento da cerveja, também possui várias enzimas em sua composição como as amilases, fosforilases, glucanases e proteases, que são ativadas durante o processo de malteação. Além disso, possui alto teor de amido, sendo que essa quantidade é ideal em relação ao conteúdo de proteínas presente (DA SILVA, 2013; OLIVEIRA; ARAÚJO e SERRANO, 2015).

As cervejas produzidas com 100% de malte, ou seja, sem adição de adjuntos cervejeiros, representam uma pequena parte do mercado, geralmente são produzidas por micro cervejarias, e quando fabricadas somente com um tipo de malte, podem ser ainda inferiores (MARGON e PONCIO, 2014). Ao utilizar uma matéria prima mais adequada, como somente malte de cevada para obtenção de amido, o padrão de qualidade sensorial da cerveja produzida pode aumentar, colocando as micro cervejarias em destaque, já que a grande maioria segue a lei da pureza alemã (*Reinheitsgebot*), estabelecendo que as cervejarias utilizem 100% de malte de cevada (CURI; VENTURINI e NOJIMOTO, 2009; RODRIGUES, 2012).

Um estudo realizado por Sleiman et al. (2010) mostrou que em 161 amostras de cervejas pilsen produzidas por grandes cervejarias no Brasil, 95,6% possuíam adjuntos cervejeiros derivados de açúcar e milho na sua composição. Além da perda de qualidade sensorial, essas cervejas apresentam diminuição de cor, corpo, aroma e sabor (SLEIMAN et al., 2010). No entanto, o baixo custo de produção aliado à característica altamente refrescante torna estes produtos altamente competitivos no mercado, atendendo um filão de público específico (DINSLAKEN, 2017).

2.2.3. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma trepadeira que pertence à família das moráceas. Esta planta é uma espécie que apresenta dificuldade de cultivo, porém, tem capacidade para adaptar-se em regiões com clima temperado (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). Na fabricação de cerveja, são empregadas apenas os cones das flores femininas secas do lúpulo, responsáveis por fornecer os compostos amargos e os óleos essenciais característicos, que são transmitidos como sabor e aroma para a bebida (KUCK, 2008). As resinas contidas nos cones das flores lúpulo podem ser extraídas e fracionadas de acordo com a Figura 2.2.

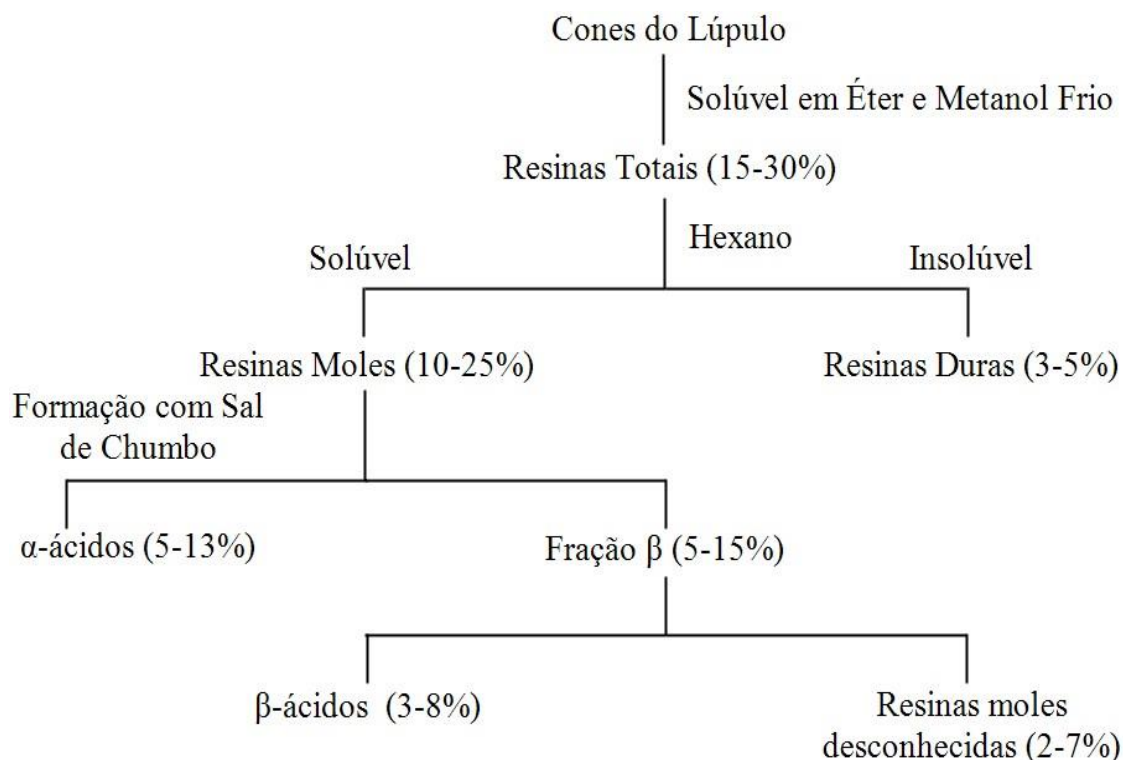


Figura 2.2. Fracionamento das resinas contidas no lúpulo (Hough et al., 1971).

Os compostos de maior interesse no lúpulo são as resinas moles, compostas principalmente de Humulona (α -ácidos) e Lupulona (β -ácidos). Geralmente o teor de α -ácidos é superior em relação ao teor de β -ácidos e suas quantidades alteram conforme a variedade de lúpulo (ARAÚJO, 2016). As estruturas dessas resinas estão apresentadas na Figura 2.3.

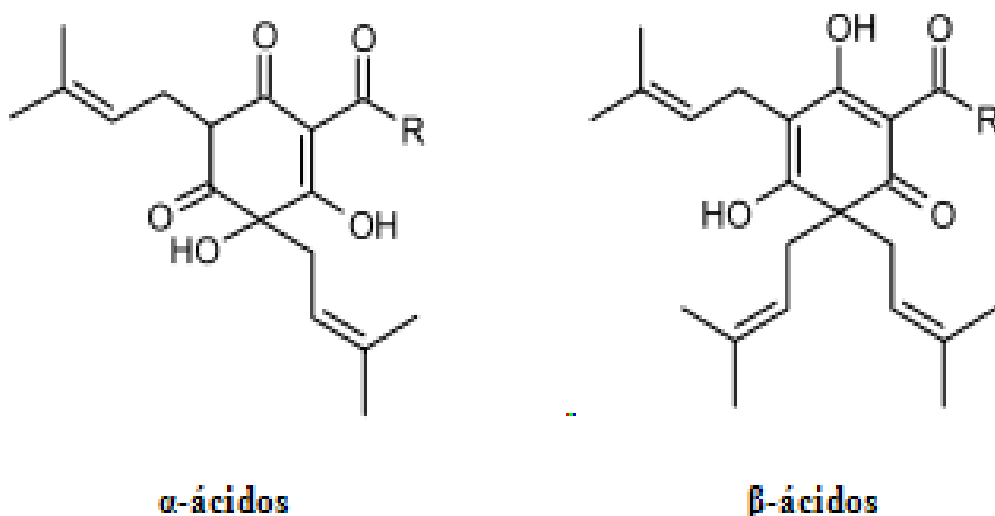


Figura 2.3. Principais resinas presentes no lúpulo. SAKAMOTO; KONINGS (2003).

O lúpulo recebe dois tipos de classificações, sendo diferenciados entre lúpulo de amargor e lúpulo de aroma em relação às suas características químicas. Sua composição depende da variedade produzida que recebe o nome de acordo com a região de origem, porém a principal diferença entre esses lúpulos é o conteúdo de α -ácidos e óleos essenciais. O lúpulo de amargor possui maior quantidade de α -ácidos em relação ao lúpulo de aroma. Já o lúpulo de aroma caracteriza-se por possuir maiores concentrações de óleos essenciais em comparação ao lúpulo de amargor (OLIVEIRA; ARAÚJO e SERRANO, 2015; DUARTE, 2015).

O amargor proporcionado pela adição do lúpulo na cerveja é avaliado como parâmetro importante no controle de qualidade do produto durante as etapas de produção, podendo ser analisado na fervura e nas etapas posteriores de fermentação e maturação. Durante esses processos o amargor sofre diminuição em seu valor, o qual também é afetado durante o tempo de prateleira com a degradação dos iso- α -ácidos (ANGELONI, 2016; POPESCU et al., 2013).

Para quantificar o amargor na cerveja realizam-se medidas da quantidade de iso- α -ácidos, sendo estas expressas na unidade de IBU (International Bitterness Unit). O equipamento mais utilizado para avaliar o amargor é o espectrofotômetro UV-VIS. Outras técnicas com maior precisão que também podem ser utilizados são a cromatografia líquida ou gasosa e também a espectrometria de fluorescência, com medidas realizadas no comprimento de onda de 275nm (DOS SANTOS, 2013).

Atualmente, a Alemanha ainda é o país com a maior produção de lúpulo do mundo, com destaque para a região de Hallertau situada na Baviera (BIER, 2017).

Podemos também encontrar cervejas produzidas por micro cervejarias com adição de lúpulo brasileiro, mostrando que esta planta possui a capacidade de adaptar-se em algumas regiões do Brasil (NETO, 2018).

A produção de lúpulo nacional no ano de 2017 possuía uma expectativa de colheita de 1,5 toneladas, sendo capaz de abastecer algumas micro cervejarias, dessa forma, promovendo um melhor custo-benefício em relação ao lúpulo importado (VASCONCELOS, 2017). A Figura 2.4.a ilustra a produção de lúpulo de uma micro cervejaria localizada na cidade de Campos do Jordão-SP, e a Figura 2.4.b mostra uma plantação de pequeno porte para fabricação de cerveja artesanal na região de Guarapuava-PR.



Figura 2.4. Plantas de lúpulo cultivadas em território brasileiro. (A) Cultivo de lúpulo em Campos do Jordão-SP; (B) Planta de lúpulo em Guarapuava-PR. Adaptado de BREWFEEED (2018).

O lúpulo adicionado nas cervejas pode ser encontrado em diversas formas: pellets, plugs flores e extrato concentrado. Os pellets são atualmente a forma mais utilizada devido à sua praticidade. No entanto, algumas micro cervejarias e alguns cervejeiros artesanais preferem a utilização do lúpulo fresco na forma de flores, por entenderem que os compostos que conferem aroma e sabor ao produto final estão mais presentes na matéria prima em natura. Entretanto, sua maior superfície de contato pode causar a oxidação dos compostos amargos e perda de sua qualidade. A Figura 2.5 apresenta o lúpulo comercial encontrado no formato de pellets. (SCHORK, 2015; RANGEL, 2016)



Figura 2.5. Lúpulo comercial em pellets.

2.2.4. Levedura

As leveduras são microrganismos unicelulares do reino fungi, pertencentes ao gênero *Saccharomyces cerevisia*, que vêm sendo utilizadas na produção de cervejas e de pães por vários milênios. Ao longo do tempo, essas leveduras foram modificadas geneticamente com a finalidade de aumentar sua eficiência e produtividade durante a fermentação. Além disso, o melhoramento genético promovido nas leveduras influenciou também na obtenção de cervejas de maior qualidade e no desenvolvimento de novos tipos de cerveja (CARVALHO; BENTO e SILVA, 2006).

Nos primórdios da produção de cerveja, a levedura não era adicionada como ingrediente, sendo que o processo de fermentação ocorria espontaneamente pela ação dos microrganismos presentes no ambiente, conhecidas popularmente por leveduras selvagens. Atualmente mais de 120 leveduras selvagens foram isoladas e são consideradas contaminantes, por prejudicar a velocidade da fermentação e provocar alterações nas características organolépticas da bebida (OLIVEIRA., 2011; CAVALCANTE, 2016). Esse tipo cerveja ainda é produzido, sendo conhecida como cerveja estilo lambic.

As diferentes cepas de leveduras podem caracterizar dois tipos de cerveja: baixa fermentação (*Lager*) e alta fermentação (*Ale*), como previamente mencionado. Durante a fermentação, a levedura *S. cerevisiae* metaboliza vários açúcares, tais como glicose, frutose, maltose, maltotriose e sacarose entre outros (Figura 2.6), além disso, utiliza alguns aminoácidos, peptídeos, vitamínicos e minerais como fonte de energia, promovendo seu crescimento e a fermentação da bebida (D'AVILA et al., 2012; SENAI, 2018).

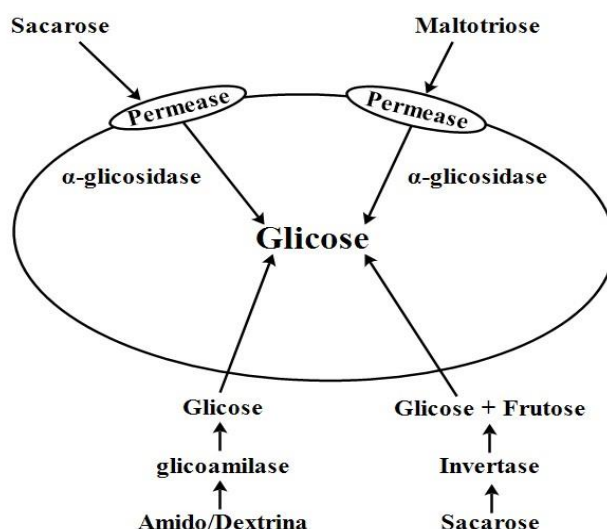


Figura 2.6. Carboidratos metabolizados pela levedura *S. cerevisiae*. Adaptado de SENAI (2018).

2.3. Processamento

O processamento da cerveja é realizado através de diversas fases, com destaque para quatro etapas principais: brassagem, fervura, fermentação e maturação que estão esquematizadas no fluxograma da Figura 2.7. Estas etapas serão descritas detalhadamente a seguir.

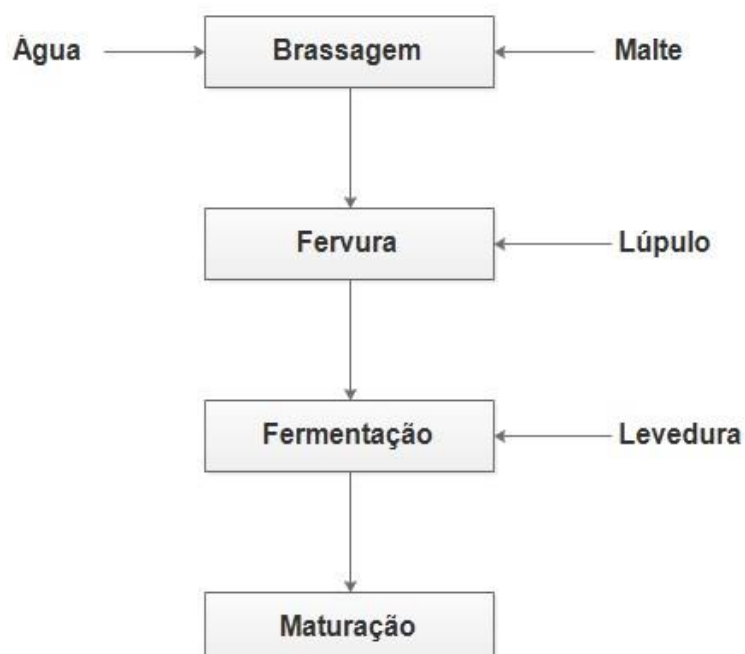


Figura 2.7. Principais etapas da produção de cerveja. Adaptado de (DE ALMEIDA, 2011).

2.3.1. Brassagem

Durante a etapa de brassagem são realizados vários procedimentos. Tais procedimentos compreendem a moagem do malte, sua incorporação na água, aquecimento e filtração. O malte moído é misturado à água com finalidade de converter o amido em açúcares. O aquecimento é mantido durante todo o processo com patamares de temperatura variados para favorecer a dissolução do malte. Em seguida, é realizada uma filtração com a finalidade de separar o bagaço de malte do líquido açucarado que segue posteriormente para a etapa de fervura (HANSEN, 2011; KUCK, 2008; MATSUBARA et al., 2006).

A moagem adequada do malte tem como objetivo uma melhor atuação das enzimas presentes na casca do malte, através da desintegração total do endosperma, e minimizar a quantidade de farinha produzida com baixa granulometria, a qual pode dificultar a filtração posterior do bagaço de malte. Desta forma, uma granulometria muito baixa não é desejada (VENTURINI FILHO, 2005).

O malte previamente moído é então misturado com água, ocorrendo a reação de hidrólise do amido que estava presente na parte interna do grão, pela ação das enzimas contidas na casca do malte, principalmente pelas enzimas α -amilase e β -amilase. A escala de temperatura e pH da água deve ser adequada para que as enzimas atuem de maneira eficiente (CARVALHO, 2009). A Tabela 2.3 apresenta os valores ideais de temperatura e pH para atuação de cada enzima.

Tabela 2.3. Atuação enzimática e valores ideais de pH e temperatura.

Enzima	Atuação	pH	Temperatura °C
Hemicelulase	Decomposição da Hemicelulose	4,5-4,7	40-45
Exo-peptidase	Decomposição de proteínas	5,2-8,2	40-50
Endo-peptidase	Decomposição de proteínas	5,0	50-60
Dextrinase	Decomposição do amido	5,1	55-60
β -amilase	Decomposição do amido	5,4-5,6	60-65
α -amilase	Decomposição do amido	5,6-5,8	70-75

Fonte: Adaptado de (TSCHOPE, 2001).

O final da reação de hidrólise do amido pode ser verificado com o teste de iodo, realizando a mistura de uma alíquota do mosto com uma solução de iodo $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$. Quando a coloração na mistura for amarelada é certificado que todo amido foi degradado (ROSSONI, 2017). Esse teste é aplicado tanto para pequenas produções como em grandes cervejarias (CAVALCANTE, 2016). Após a decomposição total do amido em açúcares fermentáveis e não fermentáveis, a temperatura é elevada para aproximadamente 80°C promovendo a inativação das enzimas (Bandinelli, 2015).

A etapa de brassagem é finalizada no interior da tina de filtração com a separação dos sólidos do mosto, onde uma camada filtrante é formada pelo bagaço do malte na superfície do filtro com ranhuras (Pakcreens). Em seguida, é realizada uma lavagem do bagaço com água quente, extraindo os açúcares remanescentes do malte (TELES, 2007; CAVALCANTE, 2016).

2.3.2. Fervura

O licor açucarado obtido anteriormente é submetido à etapa de fervura. Neste momento o lúpulo é adicionado, sendo este ingrediente responsável pelo amargor e aroma da cerveja. Além disso, a etapa de fervura provoca outras transformações no mosto como a inativação das enzimas, estabilidade biológica, química e coloidal, desenvolvimento de cor, isomerização dos α -ácidos, aumento de concentração e evaporação de água e compostos voláteis indesejáveis (TELES, 2007; PAIVA, 2011).

Com uso de temperatura mais elevada durante a fervura, ocorre uma maior oxigenação do mosto, favorecendo a formação do trub quente, composto formado por taninos, complexos de proteínas e resinas. O trub quente também pode ser influenciado pelo tempo da fervura, aumentando sua formação com o aumento do tempo da fervura (TELES, 2007).

O desenvolvimento da cor está relacionado com a reação de Maillard e a caramelização dos açúcares. Essas reações de escurecimento não enzimáticas consomem os aminoácidos e açúcares redutores e podem causar prejuízos para etapa de fermentação. Quanto maior a intensidade da fervura, maior o rendimento dessas reações, também é possível ocorrer o escurecimento do mosto pela oxidação de taninos presentes no lúpulo, porém, com menor influência sobre a cor (RIO, 2013; TELES, 2007).

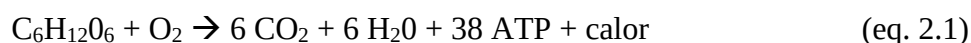
Os α -ácidos presentes na composição do lúpulo quando adicionados na etapa da fervura são convertidos em iso- α -ácidos pela reação de isomerização e assim conferindo o sabor amargo para a cerveja. Quando a fervura for conduzida na temperatura de 100°C, pH 5,2 e duração de 120 minutos, ocorre a isomerização de aproximadamente 77% dos α -ácidos. Por outro lado, ao elevar a temperatura a 130°C com redução do tempo para 30 minutos em mesmas condições de pH, a reação de isomerização atinge 100% de rendimento. Ao prolongar o tempo da fervura, as perdas e a degradação dos iso- α -ácidos sofrem um aumento (TELES, 2007).

Ao término da fervura o mosto é resfriado, precipitando o trub quente. A separação do trub é realizada por um processo chamado Whirlpool, que usa força centrípeta para depositar o trub no centro da tina de fervura, evitando que esse resíduo seja enviado para os tanques de fermentação, provocando a sedimentação da levedura e menor conversão dos açúcares fermentáveis (OLIVEIRA; ARAÚJO; SERRANO, 2015). O resfriamento depende do tipo de levedura utilizada na etapa da fermentação, variando na faixa de temperatura de 7 a 22°C. O mosto enviado para a fermentação deve ser previamente aerado, em torno de 20 ppm de oxigênio, além disso, o pH pode ser ajustado para o valor ideal de 4,5 adicionando ácido láctico 96% (CAVALCANTE, 2016; NIEMES, 2010).

2.3.3. Fermentação

A etapa da fermentação tem início com a adição da levedura ao mosto resfriado no interior do tanque de fermentação. A temperatura precisa ser rigorosamente controlada durante todo o processo, garantindo assim a qualidade sensorial e as características físico-químicas da cerveja produzida (DA SILVA, 2013; CAVALCANTE, 2016).

As duas reações principais pela ação da levedura durante a fermentação é a conversão dos açúcares fermentáveis em álcool e produção de gás carbônico. No entanto, diversas reações químicas secundárias ocorrem, com a formação de vários compostos como ésteres, ácidos carboxílicos, aldeídos, sulfetos e demais substâncias desejáveis ou indesejáveis, muitos desses compostos podem permanecer no produto final, provocando mudanças nas características sensoriais (DA SILVA, 2013). A formação de ácidos orgânicos durante a fermentação provoca uma diminuição dos valores de pH. Abaixo, temos as principais equações químicas que representam o processo fermentativo (BANDINELLI, 2015).



A fermentação ocorre em duas vias metabólicas. No início dessa etapa, com a presença de oxigênio, a via aeróbica da levedura promove uma reação de oxidação dos açúcares, resultando na produção de gás carbônico, água e energia, além disso, essa reação é favorável energeticamente, com a finalidade de estimular o crescimento e revigoramento das células de levedura, conforme a equação 2.1 (BANDINELLI, 2015).

A segunda via anaeróbica da levedura, possui a finalidade de transformar o mosto em cerveja, pela conversão de açúcares simples como a glicose em duas moléculas de etanol, duas moléculas de gás carbônico e energia, conforme a equação 2.2 (BANDINELLI, 2015).

As leveduras podem ser reaproveitadas nos processos fermentativos. Em algumas cervejarias, a mesma levedura é reciclada por algumas vezes e até mesmo por vários anos. Este reciclo diminuiu o risco de contaminação durante a fermentação, quando realizado o tratamento da levedura entre os processos fermentativos com emprego de alguns ácidos como fosfórico, nítrico, sulfúrico e tartárico, desse modo, eliminando outros microrganismos sem prejudica-la (ROCHAEL, 2015).

Alguns estudos relatam que fatores externos afetam o desempenho da levedura durante a etapa de fermentação. Como exemplo temos a concentração celular, oxigenação do mosto, claridade do mosto, composição lipídica, fatores químicos como pH, quantidade de oxigênio, nutrientes orgânicos e minerais, fatores físicos como temperatura e pressão osmótica e fatores microbiológicos como linhagem, espécie e contaminação (BANDINELLI, 2015).

2.3.4. Maturação

A etapa maturação da cerveja é considerada como uma segunda fermentação, onde a temperatura do tanque é reduzida para 0°C com tempo estimado entre 6 a 30 dias, dependendo do estilo de cerveja produzida (CAVALCANTE, 2016; DA SILVA, 2013).

O processo de maturação da cerveja tem finalidade de melhorar alguns aspectos como sabor, aroma, clarificação da cerveja, aumento da quantidade de dióxido de carbono, decantação do fermento e redução de compostos sulfonados (DA SILVA, 2013).

Com o uso da baixa temperatura durante a maturação, ocorre a redução de compostos indesejáveis, por exemplo, as dicetonas vicinais 2,3-butanodiona e 2,3-pentanodiona com limiar de percepção de 0,15-0,20 mg L⁻¹ e 1,0 mg L⁻¹ respectivamente. Esses compostos são responsáveis por diminuir a qualidade sensorial da cerveja. Além disso, o resfriamento promove reações entre taninos e proteínas tornando-

as insolúveis, causando a precipitação destes compostos, os quais podem ser posteriormente removidos por filtração e assim evitando que a cerveja sofra turvação futuramente (CAVALCANTE, 2016; HANSEN, 2011; DA SILVA, 2013).

Ao término da maturação, a cerveja pronta é filtrada para remoção das leveduras e demais compostos insolúveis. Em seguida, a bebida recebe adição de gás carbônico de acordo com o estilo produzido e segue para o envase em barris, latas ou garrafas (HANSEN, 2011).

2.4. Controle de Qualidade

A obtenção de uma cerveja de qualidade depende tanto da matéria prima utilizada, quanto do controle dos processos de produção e até mesmo estocagem do produto final. A utilização de malte, água e lúpulo de qualidade vão conferir adequadas propriedades à cerveja. Por exemplo, o malte é o ingrediente que mais apresenta influência nas características finais da bebida, tais como cor, aroma, sabor e corpo da cerveja (CERVESIA, 2018). Por outro lado, a água, ingrediente em maior quantidade na produção da cerveja, deve ser extremamente pura, sendo inodora, insípida e livre de micro-organismos que podem comprometer a qualidade do produto. O lúpulo, adicionado para conferir amargor, também deve ser de adequada qualidade, e diferentes variedades podem ser utilizadas de acordo com o estilo de cerveja desejado. Além dos três ingredientes principais supracitados, leveduras de cepas selecionadas são utilizadas para a fermentação e podem modificar o perfil sensorial da bebida (REBELLO, 2009). A escolha da levedura também produz diferentes tipos de cerveja, de baixa ou alta fermentação. A levedura após o seu uso na fermentação pode ser reutilizada em novos ciclos fermentativos, prática esta seguida por algumas micro e grandes cervejarias. Entretanto, a reutilização indiscriminada deste produto, pode acarretar na perda de qualidade do produto final (MATHIAS; MELLO e SERVULO, 2014).

O controle de qualidade realizado em todas as etapas do processo de produção da cerveja, desde a brassagem até a maturação, é importante para a obtenção de um produto final com adequadas características físico-químicas, microbiológicas e agradável ao público (sensorial) (FERREIRA; BENKA, 2014). Para as análises físicoquímicas, geralmente os parâmetros pH, acidez, grau alcoólico, cor, amargor, entre outros são estudados.

2.4.1 pH

Para a produção da cerveja, o pH deve ser rigorosamente controlado durante todas as etapas. Na brassagem, o pH tem importância no controle da atividade enzimática responsável pela conversão do amido em açúcares, influenciando no rendimento da produção. Na fervura, o pH tem influência principal no desenvolvimento da cor da cerveja (reação de Maillard/caramelização), no amargor e na formação do trub quente, precipitado e removido nesta etapa. Caso este processo não ocorra eficientemente, o carregamento de proteínas e outros compostos, que deveriam ter sido removidos com trub quente no whirlpool, para a etapa de fermentação, pode prejudicar o desempenho da levedura (CERRI, 2012). Outro fator relevante, refere-se à produção de ácidos orgânicos, como o ácido acético, que em excesso podem prejudicar a qualidade sensorial da cerveja (acidez total). Durante a etapa de maturação o pH também desempenha papel importante na formação da espuma, sendo esta mais um dos fatores importantes na qualidade da cerveja (VIEJO et al., 2010).

2.4.2 Amargor

O amargor é um importante parâmetro de qualidade da cerveja. O controle deste parâmetro é essencial para uma boa experiência sensorial do produto por parte dos consumidores. A diminuição do amargor pode ocorrer por dois processos diferentes, sendo o primeiro referente à perdas dos iso- α -ácidos durante os processos de fabricação, e o segundo, ocorre durante a estocagem do produto final (CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012 e POPESCU et al., 2013). Popescu e colaboradores (2013) estudaram o decaimento dos valores do amargor em 10 amostras de cervejas escuras e 10 claras durante os processos produção. As perdas nas unidades de amargor (IBU) durante o processo, desde a fervura ao envasamento foram de 24,7 a 41,54% no produto final. Caballero e colaboradores (2012) estudaram a perda do amargor e da qualidade de cervejas durante o período de estocagem do produto final envasado. As modificações nas características das cervejas foram atribuídas à vulnerabilidade dos iso- α -ácidos à luz e sua oxidação. Os autores apontam que existe uma diferença estrutural na molécula do iso- α -ácidos, o qual possui dois isômeros estruturais, conforme apresentado na Figura 2.8 (CABALLERO; BLANCO; PORRAS, 2012). Além destas medidas, boas práticas cervejeiras podem limitar a concentração do oxigênio e de espécies reativas de oxigênio, diminuindo a oxidação e a utilização de frascos que impeçam a penetração de luz evitam a fotodegradação (POPESCU et al., 2013).

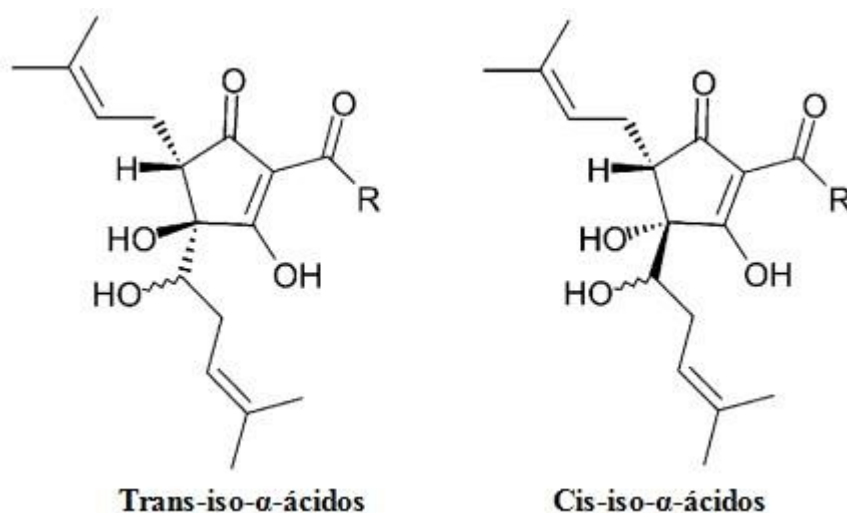


Figura 2.8. Principais isômeros presentes no lúpulo (trans e cis iso- α -ácidos). (VANHOENACKER; DE KEUKELEIRE e SANDRA, 2004).

Vários estudos apontaram que o envelhecimento da cerveja promove a degradação dos trans-iso- α -ácidos, enquanto que seu similar cis-iso- α -ácidos é estável (CABALLERO; BLANCO e PORRAS, 2012). Os autores ainda apontam para medidas que podem ser tomadas com o objetivo de estabilizar o amargor do produto. Dentre as medidas podem ser citadas: adição de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, adição do isômero puro cis-iso- α -ácidos ou suas espécies reduzidas, ou o uso de riboflavinas ligadas a proteínas (CABALLERO; BLANCO e PORRAS, 2012).

2.4.3 Cor da cerveja

A cor é uma característica muito importante nas cervejas. Além de ter papel importante no aspecto visual do produto, também pode diferenciar os estilos de cerveja. As diferentes cores de cervejas são naturalmente obtidas através da torra do malte (DUARTE, 2015). Os fatores que conferem cor à cerveja são a melanina e caramelo presentes no malte (BRUNELLI; MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014). As reações que irão dar origem a cor da bebida são conhecidas com reações de Maillard ou reações de caramelização. BRUNELLI e colaboradores (2014) realizaram a caracterização físico-química de cervejas produzidas com mel. Um dos parâmetros de qualidade estudados foi a cor da cerveja. Os autores observaram que os valores de cor das bebidas sofreram variações de intensidade, ocorrendo uma diminuição em relação aos valores de cor dos respectivos mostos. Essa diminuição de cor foi atribuída à eliminação de matéria corante pela espuma durante a etapa de fermentação e pela redução de taninos pela ação das leveduras. Além disso, fatores com o pH mais ácido e redução do extrato primitivo,

podem influenciar na diminuição da cor. O extrato primitivo tem papel na cor do produto, uma vez que compostos fenólicos e outras matérias corantes são provenientes da casca do malte (MANSANO, 2010).

2.4.4 Acidez

Outra característica importante para a qualidade da cerveja é a sua acidez. A acidez total na cerveja é relacionada a todos os ácidos orgânicos tituláveis, diferenciando-se do parâmetro de pH por seus valores não serem necessariamente cátions hidrogênio (H_3O^+) (GOIANA et al., 2016). Essa análise pode indicar ocorrência de contaminação microbacteriana da cerveja, porém, seus valores podem também se modificar de acordo com as matérias primas utilizadas na fabricação, tais como uso de adjuntos, malte de trigo ou apenas malte de cevada. Quando usado apenas malte de cevada, os valores de acidez podem ser maiores. A acidez dependendo ainda da porcentagem de maltes torrados adicionados para confecção dos diferentes estilos, que resultam em uma acidez total ainda maior (ALMEIDA e BELO, 2017). Outra prática que pode alterar a acidez de uma cerveja, é a adição de frutas, como o tamarindo, durante o processo de produção da cerveja (CARNEIRO, 2016), sendo que a literatura recomenda uma acidez total de 0,1 a 0,3% de ácido láctico (ALMEIDA e BELO, 2017).

2.4.5 Teor alcoólico

Um outro parâmetro importante em uma cerveja é seu grau alcoólico. Usualmente cervejas comerciais com álcool apresentam teor alcoólico compreendido entre 3 a 8% (Da Silva 2013). O grau alcoólico do produto final reflete as condições utilizadas no preparo da bebida. A adição de uma maior quantidade de malte ou adjunto cervejeiro (extrato primitivo) resulta na maior produção de álcool durante a fermentação, elevando o teor alcoólico. Brunelli e colaboradores (2014), por exemplo, observaram que a adição de mel durante a etapa de brasagem, resultou em maior grau alcoólico no produto final. Outro procedimento para alterar o teor alcoólico é a utilização de diferentes cepas de leveduras. As leveduras têm a função de converter os açúcares em álcool e gás carbônico e diferentes cepas apresentarão diferentes taxas de fermentação. A mensuração do quão completa foi a fermentação é chamada atenuação. Desta forma, cepas de alta atenuação produzirão cervejas menos encorpadas e com maior teor alcoólico devido à maior conversão dos açúcares em álcool (fermentação).

No mesmo sentido, cepas de baixa fermentação produzirão cervejas com maior concentração de açúcares e menor teor de álcool (DA SILVA et al., 2009).

2.4.6 5-Hidroxi-2-metilfurfuraldeído (HMF)

Estes parâmetros previamente citados são muito importantes para a qualidade da cerveja. No entanto, outros compostos orgânicos podem interferir na qualidade da cerveja. Diversos aldeídos podem ser encontrados na cerveja como acetaldeído, trans-2-nomenal, furfural, 5-hidroxi-2-metilfurfural e aldeídos fenólicos. Alguns desses compostos afetam a qualidade da cerveja de forma positiva quando encontrados em baixas concentrações, porém, geralmente contribuem de forma negativa no sabor da cerveja (WYLER, 2013). No caso do composto HMF, o mesmo não possui valor nutricional e está relacionado com reações de desenvolvimento de cor, além disso, provoca alteração em características organolépticas da cerveja, tais como sabor, aroma e cor, reduzindo assim a qualidade da bebida (POLICARPO, 2012; DE ANDRADE, 2014).

A origem do HMF na cerveja pode ser atribuída às matérias primas, oriundas do processo de malteação. Em adição, o HMF também pode ser formado na etapa de fermentação e por reações químicas durante o processo de produção da cerveja como as reações de Maillard (SAISON et al., 2009; BIAZON, 2008). A Figura 2.9 apresenta a fórmula estrutural do HMF.

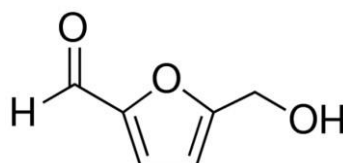


Figura 2.9. Fórmula estrutural do HMF (WROLSTAD, 2013).

Devido à preocupação em torno da presença do HMF em alimentos alguns trabalhos se preocuparam com a necessidade de determinação deste composto nas matrizes alimentícias. De Andrade e colaboradores desenvolveram e validaram uma metodologia para a determinação do HMF em amostras de xarope de milho e melaço de cana do Canadá e do Brasil. Além da otimização, várias amostras foram analisadas quantitativamente e apontaram para elevados valores de HMF nestes alimentos. Concentrações de 109,2 a 2121,3 mg Kg⁻¹ de HMF foram determinadas nas amostras de xarope (DE ANDRADE, 2016). Truzzi e colaboradores (2012) compararam dois métodos para a determinação de concentrações muito baixas de HMF em amostras de mel. Os

métodos estudados foram o HPLC e espectrofotométrico, mostrando-se o primeiro mais adequado. Várias amostras foram analisadas e as concentrações de HMF determinadas foram inferiores a 4 mg Kg^{-1} . Entretanto, para bebidas tais como cervejas, poucos trabalhos realizaram a determinação deste composto. Li e colaboradores (2009) analisaram cervejas maturadas e não maturadas. Concentrações de HMF de 0,7 a $1,91 \text{ mg L}^{-1}$ foram determinadas (WU; SHI e FENG, 2009). Wyler (2013) estudou a concentração de HMF em cervejas maturadas em barris de carvalho, bem como a variação do HMF em função do tempo de prateleira em um período de dois meses. As bebidas maturadas nos barris de carvalho apresentaram concentrações de 0,4 a $4,6 \text{ mg L}^{-1}$ de HMF. Após o tempo de prateleira as concentrações de HMF permaneceram em torno de $3,5 \text{ mg L}^{-1}$.

Como pôde ser visto, vários parâmetros da cerveja influenciam na qualidade e características do produto final. Desta forma, um acompanhamento criterioso durante todas as etapas de produção se faz necessário. Os trabalhos, até o momento publicados, que realizaram avaliações de parâmetros físico-químicos na cerveja, o fizeram principalmente no produto final. Além disso, a determinação do HMF não é usual neste tipo de bebida bem como uma avaliação estatística aprofundada dos parâmetros analisados. Desta forma, neste trabalho se propõe determinar parâmetros físico-químicas e o teor de HMF em cervejas e nas diferentes etapas de produção. Além disso, um acompanhamento estatístico foi realizado para verificar se haviam diferenças nas etapas de produção de cerveja e entre amostras diferentes.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, D. S. DE; BELO, R. F. C. ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DE CERVEJAS ARTESANAIS E INDUSTRIAIS COMERCIALIZADAS EM SETE LAGOAS-MG. **REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS DA VIDA**, v. 5, n. 5, p. 1–16, 2017.

ANDRADE, JUCIMARA KULEK DE. Otimização E Validação De Metodologias Analíticas Para Determinação De 5-(Hidróximetil)-2-Furaldeído (Hmf) Em Alimentos Com Altos Teores De Açúcares. **universidade estadual do centro oeste-UNICENTRO**, p. 122, 2014.

ANGELONI, L. H. P. ” **Cerveja envelhecida em barril de madeira , aspectos químicos e microbiológicos**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotecnologia: Alimentos e bebidas produzidos por fermentação , vol. 5, p. 44-78. CNo Title**. 5ª ed. São Paulo: [s.n.].

ARAÚJO, G. S. **ELABORAÇÃO DE UMA CERVEJA ALE UTILIZANDO MELÃO DE CAROÁ [Sicana odorífera (Vell.) Naudim] COMO ADJUNTO DO MALTE**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2016.

BANDINELLI, P. C. Estudo de caso de melhoria no Processo de Mosturação de uma cervejaria no RS. **Departamento de Engenharia Química (DEQUI), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRS)**, 2015.

BIAZON, C. L. **Utilização de adsorventes durante o processo de microextração em fase sólida de flavours de cerveja**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

BIER, O. **10 fatos incríveis que você precisasaber sobre o lúpulo**. Disponível em: <<https://opabier.com.br/blog/10-fatos-incriveis-que-voce-precisa-saber-sobre-olupulo/>>. Acesso em: 15 mar. 2018.

BREWFEED. **Boas notícias para o lúpulo brasileiro Mantiqueira**. Disponível em: <<https://brewfeed.me/news/boas-noticias-para-o-lupulo-brasileiro-mantiqueira-181>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

BRUNELI, L. T.; MANSANO, A. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 19–27, 2014.

CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Trends in Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 21–30, 2012.

CARNEIRO, R. S. **Elaboração de Cerveja Artesanal Estilo Saison Ale Contendo Tamarindo**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

CARVALHO, G. B. M. DE; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. DE A. E. ELEMENTOS BIOTECNOLÓGICOS FUNDAMENTAIS NO PROCESSO CERVEJEIRO : 1º PARTE – AS LEVEDURAS. **Universidade de São Paulo**, 2006.

CAVALCANTE, G. P. **Produção de cerveja Pilsen com adição de diversas matérias-primas amargas da região Sul do Brasil** . [s.l.] Universidade Estadual do Centro Oeste, 2016.

CERRI, C. F. F. **Utilização de arroz preto do tipo IAC-600 (Oryza sativa) como adjunto para a produção de cerveja**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

CERVESIA. **Tipos de Malte**. Disponível em: <<https://www.cervesia.com.br/artigostecnicos/tecnicos/materia-prima/malte/819-tipos-de-malte.html>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

CURI, R.; VENTURINI, W.; NOJIMOTO, T. Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte: análises físico-química e sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 106–112, 2009.

D'AVILA, R. et al. Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, v. 8, n. 2, p. 60–68, 2012.

DA SILVA, A. E. et al. Elaboração de Cerveja com Diferentes Teores Alcoólicos Através de Processo Artesanal. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 369–374, 2009.

DA SILVA, G. C. **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE “OFF-FLAVOURS” EM CERVEJA**. [s.l.] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2013.

DE ALMEIDA, N. E. C. **Reatividade de iso- α -ácidos e seus derivados hidrogenados frente ao radical 1-hidroxietila: implicações na perda de qualidade sensorial da cerveja**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

DINSLAKEN, D. **Malte cristal e malte caramelo**. Disponível em: <<https://concerveja.com.br/2017/05/31/maltes/>>. Acesso em: 22 jan. 2018.

DOS SANTOS, D. C. **Uma Revisão sobre o Amargor da Cerveja, suas Causas e Quantificação**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

DUARTE, L. G. R. **Avaliação de emprego de café torrado como aromatizante na produção de cervejas**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

EVANGELISTA, A. F. et al. Produção e estudo do potencial de hidrólise de uma nova fonte de enzimas amilolíticas a partir do malte de milho (Zea mays). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2005.

FERREIRA, A. D. S.; BENKA, C. L. **Produção De Cerveja Artesanal a Partir De Malte Germinado Pelo Método Convencional E Tempo Reduzido De Germinação**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

GOIANA, M. L. et al. **Análises Físico-Químicas de Cervejas Artesanais Pale Ale Comercializadas em Fortaleza, Ceará**. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Anais...** Gramado: FAURGS, 2016

HANSEN, M. F. **Avaliação dos Processos de Oxidação em Cervejas Tipo Pilsen**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2011.

HOUGH, J. S., BRIGGS, D. E., AND STEVENS, R. **Malting and Brewing Science**. 1^a ed. London: [s.n.].

KOWALSKI, S. et al. 5-hydroxymethyl-2-furfural (HMF) -heat-induced formation, occurrence in food and biotransformation - A review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 63, n. 4, p. 207–225, 2013.

KUCK, L. S. **Cerveja: Sabor e Aroma**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2008.

MANSANO, A. R. **Produção de cerveja, utilizando méis de diferentes origens botânicas como adjuntos**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2010.

MARGON, R. A.; PONCIO, B. H. Utilizando Técnicas Descritivas De Análise. 2014. MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M. DE; SERVULO, E. F. C. Caracterização De Resíduos Cervejeiros. **Cobeq**, p. 8, 2014.

MATSUBARA, A. K. et al. Desenvolvimento de Cerveja Artesanal de Trigo Adicionada de Gengibre (Zingiber Officinale Roscoe). In: **Tópicos em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas**. 1^a ed. [s.l.] Blucher, 2006. p. 21–48. MEGA, J. F.; NEVES, E.; ANDRADE, R. J. DE. A produção da cerveja no brasil. **Revista CITINO**, v. 1, n. 1, p. 34–42, 2011.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. **Decreto 6871/2009**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1265102>>. Acesso em: 7 fev. 2018.

NASCIMENTO, J. E. C. DO. **A FUSÃO BRAHMA-ANTARCTICA: ALTERAÇÕES NO MERCADO NACIONAL DE CERVEJAS COM O ADVENTO DA AMBEV – 1999 a 2003**. [s.l.] Universidade Federal da Bahia, 2004.

NETO, C. A. **Lúpulo de Tuiuti se adapta ao clima e já pode ser usado por cervejarias**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/sp/campinas-regiao/noticia/lupulode-tuiuti-se-adapta-ao-clima-e-ja-pode-ser-usado-por-cervejarias.ghtml>>. Acesso em: 17 fev. 2018.

NIEMES, J. P. **Preparação de Cerveja de Mel**. [s.l.] Universidade Estadual do Centro Oeste, 2010.

OLIVEIRA., N. A. M. **Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja**. [s.l.] Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

OLIVEIRA, C. J. A. DE; ARAÚJO, F. D. C.; SERRANO, H. L. **Estudo Do Uso De Adjuntos Em Mosto Cervejeiro**. [s.l.] Universidade Federal Fluminense, 2015.

PAIVA, G. M. DE. **ESTUDO DO PROCESSAMENTO E MERCADO DE CERVEJAS ESPECIAIS NO BRASIL**. [s.l.] Faculdade de Tecnologia Termomecanica, 2011.

PALMER, J.; KAMINSKI, C. **Water: A Comprehensive Guide for Brewers**. 1^a ed. [s.l.] Brewers Publications, 2013.

PERIM, G. A. et al. Influência do pH na Cerveja Artesanal. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 261–264, 2013.

POLICARPO, Â. S. R. **Contaminantes Alimentares Resultantes do Processamento Térmico: Furano e Hidroximetilfurfural**. [s.l.] Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro, 2012.

POPESCU, V. et al. A study of beer bitterness loss during the various stages of the Romanian beer production process. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 111–115, 2013.

RANGEL, J. **Da Flor ao Pellet de Lúpulo**. Disponível em: <<http://teoriadecerveja.blogspot.com.br/2016/08/os-diferentes-pellets-de-lupulo.html>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

REBELLO, F. Produção de Cerveja. **Revista Agrogeoambiental**, p. 145–155, 2009.
RIO, R. F. DO. **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**. [s.l.] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2013.

ROCHAEL, A. D. S. **Processo de Fabricação de Cerveja e Qualidade=AmBev Cervejaria Natal**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2015.

RODRIGUES, J. Produção de cerveja light segundo a lei de pureza alemã. p. 1–6, 2012.
ROSSONI, M. A. **DESENVOLVIMENTO DE CERVEJA ARTESANAL DO ESTILO KÖLSCH UTILIZANDO PINHÃO COMO ADJUNTO: ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E SENSORIAL LARANJEIRAS**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL, 2017.

SAISON, D. et al. Determination of carbonyl compounds in beer by derivatisation and headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and mass spectrometry. v. 1216, p. 5061–5068, 2009.

SAKAMOTO, K.; KONINGS, W. N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, n. 2–3, p. 105–124, dez. 2002.
SCHORK, M. D. O. **ELABORAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL TIPO ALE COM MALTE DE MILHO E FARINHA DE ARROZ**. [s.l.] UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, 2015.

SCHUH, S.; PRECI, D. **Matérias-primas e etapas de processamento para elaboração de cerveja**. 1º Simpósio de Agronomia e Tecnologia em Alimentos. **Anais...Itapiranga: FAI Faculdades**, 2014

SENAI. **Entendendo a Levedura Cervejeira.** Disponível em: <http://www.agraria.com.br/extranet/arquivos/agromalte_arquivo/mod_3_fermentacao_e_maturacao.pdf>. Acesso em: 28 mar. 2018.

SLEIMAN, M. et al. DETERMINAÇÃO DO PERCENTUAL DE MALTE E ADJUNTOS EM CERVEJAS COMERCIAIS BRASILEIRAS ATRAVÉS DE ANÁLISE ISOTÓPICA. **Ciencia e Agrotecnologia**, v. 34, n. 1, p. 163–172, 2010.

STRONG, G.; ENGLAND, K. **Beer Judge Certification Program 2015 Style Guidelines** **Beer Judge Certification Program**, 2015. Disponível em: <https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf>

TELES, J. A. **ESTUDO DA PRODUÇÃO DE MOSTO CONCENTRADO LUPULADO A PARTIR DE EXTRATO DE MALTE CONCENTRADO, XAROPE DE ALTA MALTOSE E LÚPULO.** [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2007.

TSCHOPE, E. C. **MICROCERVEJARIAS E CERVEJARIAS A HISTORIA A ARTE E A TECNOLOGIA.** 1ª ed. São Paulo: [s.n.].

VANHOENACKER, G.; DE KEUKELEIRE, D.; SANDRA, P. Analysis of iso- α -acids and reduced iso- α -acids in beer by direct injection and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection or with mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1035, n. 1, p. 53–61, 2004.

VASCONCELOS, Y. **Inovações cervejeiras.** Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/2017/01/09/inovacoes-cervejeiras/>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Bebidas.** 1ª ed. São Paulo: [s.n.].

VIEJO, C. G. et al. Assessment of beer quality based on foamability and chemical composition using computer vision algorithms, near infrared spectroscopy and artificial neural networks modelling techniques. 2010.

WROLSTAD, R. E. Food Carbohydrate Chemistry. **Food Carbohydrate Chemistry**, p. 1–217, 2013.

WU, J. Y.; SHI, Z. G.; FENG, Y. Q. Determination of 5-hydroxymethylfurfural using derivatization combined with polymer monolith microextraction by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 3981–3988, 2009.

WYLER, P. **Influência da Madeira de Carvalho na Qualidade da Cerveja Piracicaba.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

CAPÍTULO 3. AMOSTRAGEM

CAPÍTULO 3. AMOSTRAGEM

3.1. Amostras de Cerveja

Neste capítulo serão descritas informações relacionadas às amostras das etapas de produção de cerveja, contendo a codificação das amostras, data de fabricação, lote da matéria prima e formulações de forma reduzida (Tabela 3.1), sendo que as informações completas referentes às coletas estão apresentadas no Anexo A.

Tabela 3.1. Informações referentes à amostragem na micro cervejaria

Amostra	ID	Data de Fabricação	Lote da Matéria Prima	Formulação (%)
1	B1 Manhã e Tarde	14/03/17	Malte A	Valor Original
	FV1 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma A	
	FT1	21/03/17	GrLv 5	
	M1	08/04/17		
2	B2 Manhã e Tarde	16/03/17	Malte A	-0,18
	FV2 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma A	
	FT2	23/03/17	GrLv 6	
	M2	13/04/17		
3	B3 Manhã e Tarde	13/04/17	Malte: B	Valor Original
	FV3 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma A	
	FT3	22/04/17	GrLv 1	
	M3	03/05/17		
4	B4 Manhã e Tarde	22/04/17	Malte B	-0,18
	FV4 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma A	
	FT4	06/05/17	GrLv 2	
	M4	11/05/17		
5	B5 Manhã e Tarde	28/04/17	Malte B	Valor Original
	FV5 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma A	
	FT5	11/05/17	GrLv 3	
	M5	19/05/17		
6	B6 Manhã e Tarde	11/05/17	Malte C	-1,14
	FV6 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma A	
	FT6	19/05/17	GrLv 2	
	M6	30/05/17		
7	B7 Manhã e Tarde	12/05/17	Malte C	-1,28
	FV7 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma A	
	FT7	19/05/17	GrLv 3	
	M7	30/05/17		
8	B8 Manhã e Tarde	08/06/17	Malte D	-2,04%
	FV8 Manhã e Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma B	
	FT8	16/06/17	GrLv 4	
	M8	04/07/17		
9	B9 Manhã	09/06/17	Malte D	-1,95%
	FV9 Tarde		Lp Amargor A; Lp Aroma B	
	FT9	16/06/17	GrLv 4	
	M9	04/07/17		

¹ID: identificação das amostras (B: Brassagem; FV: Fervura; FT: Fermentação; M: Maturação). ²Data de fabricação. ³Matérias Prima (Lp: Lúpulo; GrLv: Geração Levedura). ⁴Formulação: (m: malte; m.a.: malte ácido). ⁵Produção (Amostras 2, 4 e 5 foram produzidas em lote de 2000 mil litros de cerveja; amostras 1 e 3 produzidas em lote de 1800 litros; amostra 9 produzida em lote de 1000 litros).

As amostras das etapas de produção de cerveja lager foram coletadas em uma Micro Cervejaria da região de Guarapuava-PR durante um período de quatro meses. As coletas realizadas foram semanais ou quinzenais, de março a julho de 2017, de acordo com os processos produtivos da empresa como ilustrado na Tabela 3.1 e nos fluxogramas das Figuras 3.1 e 3.2. Nas etapas de brassagem e de fervura as amostras foram coletadas nos períodos da manhã e da tarde correspondendo a um total de 18 amostras. Durante o processo de fabricação da cerveja, as etapas de brassagem e de fervura são realizadas em duas bateladas distintas, sendo este material correspondente ao mosto. Após a conclusão da fervura e resfriamento do mosto, os conteúdos das duas bateladas previamente fabricadas são unidos em um único tanque para a realização da fermentação e da maturação. Dessa forma, nas etapas de fermentação e de maturação foram coletadas nove amostras para cada tipo de análise físico-química a ser realizada. Todas as amostras foram acondicionadas em frascos de polipropileno e resfriadas a 0 °C na Micro Cervejaria. Logo após, estas foram transportadas até o laboratório, armazenadas em freezer (-18 °C) e mantidas congeladas até algumas horas antes da realização dos experimentos.

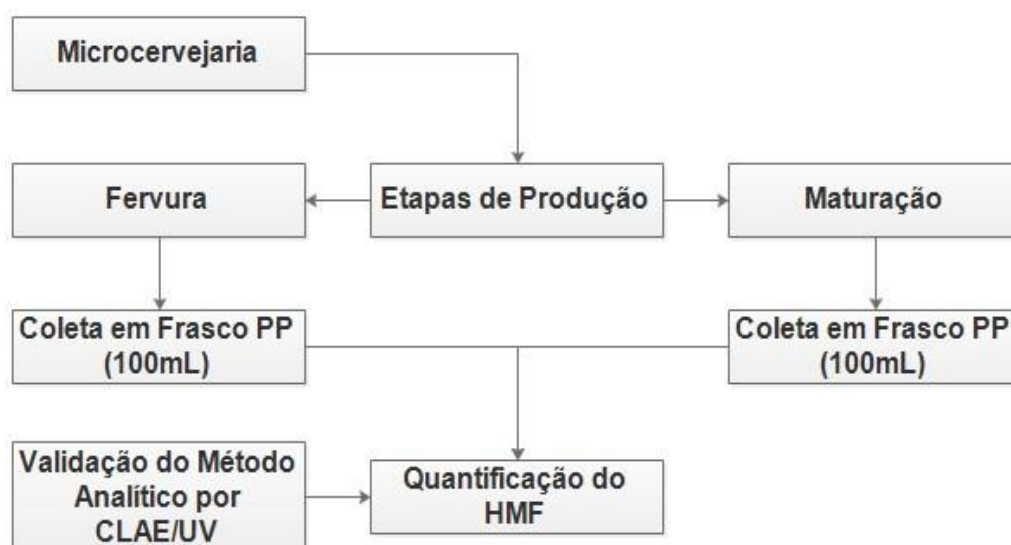


Figura 3.1. Fluxograma de coleta das amostras para a quantificação do HMF nos produtos do processo de produção da cerveja de uma Micro Cervejaria.

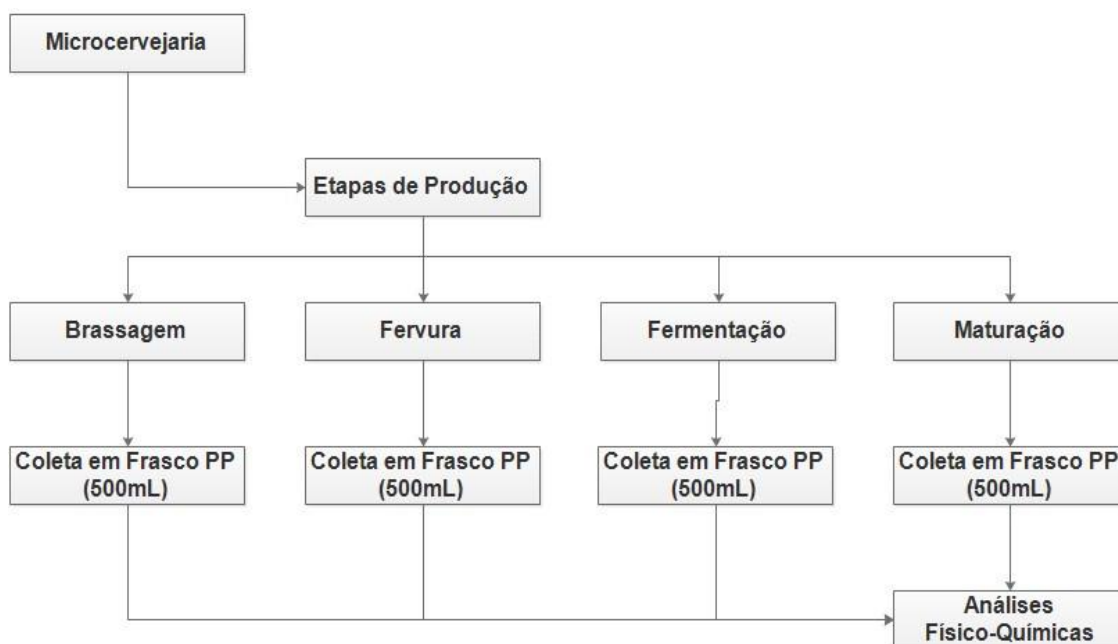


Figura 3.2. Fluxograma de coleta para as análises físico-químicas dos produtos do processo de produção da cerveja de uma micro cervejaria.

Para a quantificação do HMF as amostras foram coletadas somente nas etapas de fervura e de maturação em um volume de 100 mL, enquanto para as análises físicoquímicas as amostras foram coletadas em todas as etapas (brassagem, fervura, fermentação e maturação) em um volume de 500 mL.

3.2. Cerveja produzida na Micro Cervejaria avaliada

A cerveja é uma bebida fermentada obtida com a utilização dos ingredientes água, malte, lúpulo e levedura, sendo processada em várias etapas, dentre elas, destacamos a brassagem, a fervura, a fermentação e a maturação (DA SILVA, 2013). Para a produção da cerveja, inicialmente são escolhidas as matérias primas de acordo com o estilo a ser produzido, sendo a preferência no Brasil pela cerveja tipo *lager* estilo pilsen, fabricada de acordo com a antiga lei de pureza alemã de 1516 (PERIM; ANDRADE e RHUNA, 2013; SILVA e FARIA, 2008; ARAÚJO; SILVA e MINIM, 2003).

Após a escolha das matérias primas, o malte segue para a moagem com o objetivo de romper seus grãos expondo o amido, porém sem produzir muita farinha e mantendo parte das cascas inteiras (SCHEFFER et al., 2013). Em seguida, o malte moído é adicionado no tanque de brassagem, que contém água previamente aquecida, essa mistura é chamada de mosto cervejeiro e segue com aquecimento controlado em vários patamares de temperatura, até que todo amido seja convertido em açúcares (BORTOLI et al., 2013).

A rampa de aquecimento usada durante a brassagem define algumas características finais da cerveja tais como, grau alcoólico, corpo da cerveja e cor de acordo com o tipo e estilo de cerveja escolhido (LORENA, 2014). A Figura 3.3 mostra a diferença dos grãos de malte utilizados na produção de cerveja.



Figura 3.3. Cereal maltado utilizado para a produção de cerveja. (A) Grão de malte de cevada. (B) Grão de malte de cevada moído.

Ao término da brassagem, começa a etapa de filtração do mosto para retirada do bagaço de malte. Em seguida, o mosto filtrado segue para tina de fervura, então a temperatura é elevada para cerca de 100°C (MATSUBARA et al., 2006). Após o líquido iniciar a ebulição o lúpulo é adicionado e a fervura do mosto segue durante 60 a 90 min (CARNEIRO, 2016). Ao término da fervura, o mosto é resfriado a 10 °C para iniciar a etapa de fermentação, onde os açúcares fermentáveis serão convertidos em álcool e gás carbônico. Esta etapa geralmente tem uma duração entre 7 a 10 dias, dependendo da cepa de levedura utilizada. Ao término da fermentação, a temperatura do tanque é diminuída para aproximadamente 0 °C, promovendo a decantação da levedura que pode então ser removida do tanque. Com a baixa temperatura a etapa de maturação é iniciada e seu tempo é estimado entre 6 a 30 dias (DA SILVA, 2013).

Ao final da etapa de maturação a cerveja segue diretamente para o envase desprezando a etapa de filtração que geralmente é realizada por grandes cervejarias. Embora os aspectos visuais sejam aprimorados com a filtração, utilizando filtros em placa ou centrífugas, este procedimento remove também polifenóis e resíduos de leveduras ainda presente na cerveja, os quais conferem maior valor nutricional ao produto (VANCINI, 2015).

3.4. Referências

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. PERFIL SENSORIAL E COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CERVEJAS PROVENIENTES DE DOIS SEGMENTOS DO MERCADO BRASILEIRO 1. v. 23, n. 2, p. 121–128, 2003.

BORTOLI, DAIANE A. DA S. SANTOS, F. DOS et al. Leveduras e produção de cervejas - Revisão. **Bioenergia em revista: diálogos**, p. 45–58, 2013.

CARNEIRO, R. S. **Elaboração de Cerveja Artesanal Estilo Saison Ale Contendo Tamarindo**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

DA SILVA, G. C. **DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA IDENTIFICAÇÃO DE “OFF-FLAVOURS” EM CERVEJA**. [s.l.] Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia, 2013.

LORENA, E. D. E. E. D. E. Jéssica Dias Desenvolvimento e avaliação de uma cerveja contendo Chá Amargo como substituinte de 50% do lúpulo. 2014.

MATSUBARA, A. K. et al. Desenvolvimento de Cerveja Artesanal de Trigo Adicionada de Gengibre (Zingiber Officinale Roscoe). In: **Tópicos em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas**. 1ª ed. [s.l.] Blucher, 2006. p. 21–48.

PERIM, G. A. et al. Influência do pH na Cerveja Artesanal. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 2, n. 3, p. 261–264, 2013.

SCHEFFER, R. C. et al. Processo produtivo da cerveja tipo Pilsen. **VII Encontro de Engenharia de Produção Agroindustrial**, v. 1, p. 1–12, 2013.

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

VANCINI, D. **Plano De Negócio: Implementação De Uma Nova Fábrica De Cerveja Artesanal Em Passo Fundo-Rs**. [s.l.] Universidade de Passo Fundo, 2015.

CAPÍTULO 4. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

CAPÍTULO 4. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

A determinação do composto HMF em matrizes alimentares está em ascensão, principalmente pela preocupação da sua alta toxicidade. Além disso, o HMF também pode ser utilizado como um indicador de qualidade nos alimentos, uma vez que a elevada concentração deste contaminante indica a degradação desses produtos. Considerando-se que os estudos sobre o HMF em bebidas alcoólicas ainda são explorados com menor frequência, a avaliação da presença e concentração deste composto orgânico indesejável pode ser implementada como uma importante ferramenta no controle de qualidade de bebidas como a cerveja.

Usualmente, a determinação do composto HMF em matrizes alimentícias como mel, suco de frutas, alimentos industrializados contendo tomate, vinagres, frutas, geléia, xaropes, melado de cana e café vem sendo realizada através de métodos cromatográficos, tais como os empregados utilizando CLAE-UV (LO COCO et al., 1995; DE ANDRADE et al., 2016). Sendo assim, a mesma técnica poderia ser utilizada na determinação do HMF em cervejas. Na literatura, os estudos que realizaram a determinação de HMF em cervejas ainda são escassos. Além disso, muitas vezes foram empregados agentes derivatizantes (2,4-dinitrofenilhidrazina) que são necessários para evitar a precipitação de compostos carbonílicos (LO COCO et al., 1995; JUCHEM, 2013). A utilização de agentes derivatizantes aumenta o custo das análises e também estende o tempo de preparo de amostra. Além disso, a reação de derivatização pode não ser completa, implicando em perdas dos analitos (DA SILVA e COLLINS, 2011).

Além da necessidade de determinação do HMF em cervejas, uma vez que poucos trabalhos estudaram tal composto nesta bebida, faz-se necessário também a validação dos métodos desenvolvidos, prática está ainda mais rara. Os estudos de validação são de extrema importância para garantir a qualidade e confiabilidade dos dados e, dessa forma, evitar grandes prejuízos financeiros e decisões desastrosas.

Diante da necessidade de controle da presença e concentração do HMF em cervejas, surgiu o interesse na realização de um estudo de otimização e validação de um método empregando CLAE-UV para a determinação do HMF nestas bebidas alcoólicas. Recomendações da literatura como as encontradas nos guias do INMETRO (2011), ANVISA (2003), AOAC (2012) e NATA (2012) e em artigos sobre validação (ARAUJO, 2009; GONZÁLEZ et al., 2010) foram utilizadas para direcionar os estudos.

Desse modo, este capítulo apresenta um estudo de validação do método de CLAE-UV com injeção direta para determinação de HMF em amostras das diferentes etapas de produção de cerveja, bem como a aplicação do método validado às amostras das etapas da fervura e de maturação de cerveja *lager* descritas no capítulo 3.

4.1. Materiais e Métodos

4.1.1. Amostras

Para a realização do estudo de validação da metodologia analítica para a determinação do HMF foram escolhidas duas amostras, sendo uma amostra da etapa da fervura e uma amostra da etapa da maturação. Em seguida, estas foram submetidas a sonicação durante 16 minutos. Essas amostras foram analisadas previamente no cromatógrafo e confirmaram a ausência do composto HMF (cromatogramas não apresentados). Diante desse fato, essas amostras foram utilizadas como branco das matrizes nos ensaios de recuperação, precisão e seletividade (efeito de matriz) do estudo de validação.

4.1.2. Determinação de HMF por CLAE-UV

A determinação de HMF foi realizada de acordo com a metodologia de CLAEUV descrita por DE ANDRADE et al. (2016), que empregaram esta metodologia para determinação de HMF em amostras de mel, xarope de glicose e melaço de cana. As análises cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna cromatográfica C18 Luna da Phenomenex, com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5,0 μm , termostatizada a 30°C. A fase móvel água (0,5% de ácido fórmico) e acetonitrila, na proporção (90:10; v/v), com modo de eluição isocrática, velocidade de fluxo da fase móvel de 0,8 mL min⁻¹ e volume de injeção de 30,0 μL . O comprimento de onda de detecção utilizado foi de 285nm. Antes da injeção as amostras foram filtradas em filtro de PTFE 0,22 μm .

4.1.2.1. Reagentes

Os reagentes empregados neste trabalho foram de grau analítico e todas as soluções para o estudo de validação do HMF foram preparadas utilizando água ultrapura, purificada em sistema Direct-Q UV3[®] Millipore, com resistividade 18,2 M Ω cm, Millipore (Bedford, USA).

Para os estudos de validação da metodologia cromatográfica para determinação de HMF em cerveja, foi utilizado o padrão de 5-hidróximetil-2-furaldeído HMF (99%) Sigma-Aldrich (St Louis, Estados Unidos) e os reagentes acetonitrila grau HPLC (99,98%) JT Baker (Mallinckrodt, Estados Unidos) e ácido fórmico (85%) Synth (São Paulo, Brasil).

4.1.2.2. Equipamento e Condições de Análise

As condições das análises pelo método de CLAE/UV foram validadas no Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica da Universidade Estadual do Centro Oeste. Os ensaios cromatográficos foram realizados utilizando um cromatógrafo líquido de alta eficiência Waters Alliance 2695® com detector de arranjo de diodo (DAD) 2998 operando no comprimento de onda de 285 nm. A separação cromatográfica ocorreu numa coluna Xterra RP-18 (5,0 μm , com dimensões de 4,6 mm x 250 mm) a 30 °C. A fase móvel utilizada foi água (com adição de 0,5 % (v/v) de ácido fórmico) e acetonitrila na proporção 90:10 (v/v). A separação foi realizada no modo de eluição isocrático em um fluxo de 0,8 mL min⁻¹ e com injeção de 20 μL de amostra.

4.1.2.3. Preparo das Soluções das Amostras

A construção da curva analítica de padrão externo foi realizada pela preparação de soluções padrão utilizando 5,0 % (v/v) de etanol absoluto P.A. (99,5%) Dinâmica (São Paulo, Brasil). Essa curva de calibração foi preparada com o intuito de similar a matriz da cerveja de acordo com as recomendações de LO COCO et. al. (1995).

As soluções dos padrões de HMF foram preparadas individualmente em água ultrapura contendo 5,0 % (v/v) de etanol na concentração de 1000 mg L⁻¹ (solução estoque). Em seguida, a partir da solução estoque foi preparada uma solução contendo o padrão de HMF na concentração de 100 mg L⁻¹ (solução de trabalho). A partir da solução de trabalho foram preparadas as soluções dos padrões para as curvas analíticas através de sucessivas diluições em água ultrapura contendo 5,0 % (v/v) de etanol e as soluções das amostras das etapas de fervura e de maturação. As curvas analíticas de padrão externo e de adição de padrão foram construídas na faixa de 0,5 a 8,0 mg L⁻¹. As amostras das etapas de fervura e de maturação utilizadas como branco de amostra para construção das curvas de sobreposição de matriz foram filtradas e sonicadas durante 16 minutos em banho de ultrassom (Intertek modelo CD-4800) e injetadas por cinco vezes para determinar a ausência de HMF.

4.1.2.4. Validação do Método de CLAE-UV para Determinação de HMF em Cerveja

4.1.2.4.1. Seletividade

O parâmetro de seletividade foi determinado através da pureza do pico, comparando-se os tempos de retenção do HMF nos cromatogramas das soluções padrão e nos cromatogramas das amostras branco (cromatogramas não apresentados) e das amostras branco fortificadas com o padrão de HMF. A seletividade também foi avaliada calculando-se os intervalos de confiança das inclinações das curvas analíticas de padrão externo e de adição de padrão no nível de 95% de confiança usando a Equação 4.1 (Barros Neto, Scarmínio e Bruns, 2007; Araújo, 2009; INMETRO, 2016).

$$b_1 \pm t_{(n-2)} \times (\text{erro padrão de } b_1) \text{ (Equação 4.1)}$$

Em que:

b_1 = inclinação da curva

$t_{(n-2)}$ = número de graus de liberdade do erro padrão

4.1.2.4.2. Linearidade

A avaliação da linearidade foi realizada através da construção de curvas analíticas por padronização externa e por adição de padrão, no intervalo de concentrações de 0,5 a 8,0 mg L⁻¹.

Para a curva analítica de padrão externo foram realizadas diluições da solução padrão de trabalho em água ultrapura. A padronização por sobreposição da matriz foi realizada com uma amostra das etapas de fervura e de maturação (branco da amostra) em que o composto HMF foi removido com a utilização de banho de ultrassom conforme descrito no item 4.1.2.3.

As curvas analíticas de adição de padrão foram construídas em amostras de fervura e de maturação (branco da amostra) fortificadas em cada nível de concentração (0,5 a 8,0 mg L⁻¹) com a solução padrão do analito. Estas curvas foram utilizadas na avaliação do desempenho do método proposto e nos cálculos de recuperação (TSAI et al., 2009). As soluções foram injetadas em triplicata e as amostras de fervura e de maturação (branco da amostra) foram injetadas em duplicata.

A linearidade das curvas analíticas foi comprovada pela aplicação da técnica de regressão linear e de um teste de falta de ajuste no nível de 95% de confiança (ARAÚJO, 2009; BARROS NETO; SCARMÍNIO e BRUNS, 2007) com o auxílio do *software Minitab for Windows* versão 16. Desta análise estatística foram obtidas as equações das

curvas analíticas, os coeficientes de determinação (R^2) e os coeficientes de correlação linear (r).

4.1.2.4.3. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

A partir da avaliação dos dados de linearidade das curvas analíticas foram obtidos os valores de limites de detecção e de quantificação (LD e LQ) de acordo com ICH (2005) e ARAUJO (2009). A determinação dos respectivos limites foi realizada a partir do desvio padrão do intercepto (S) e da inclinação da curva de calibração (b), sendo calculados baseados em $LD = (3 \times S)/b$ e $LQ = (10 \times S)/b$

4.1.2.4.4. Precisão

A precisão do método foi avaliada através das estimativas de repetitividade (RSDr) e de precisão intermediária (RSDpi) utilizando-se os desvios padrão relativos (RSD). O estudo da repetitividade foi realizado com a solução resultante da adição de uma solução padrão de HMF de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ a uma amostra de maturação, que foi injetada seis vezes ($n = 6$) no mesmo dia. A precisão intermediária foi avaliada com relação ao tempo da mesma forma que a repetitividade em dois dias diferentes. Os valores de RSD (%) foram calculados a partir das determinações aplicando-se a Equação 4.3 (INMETRO, 2016).

$$RSD(\%) = \frac{s}{X_m} \times 100 \quad (\text{Equação 4.3})$$

em que:

s = estimativa do desvio padrão absoluto;

X_m = média de uma série de medidas (replicatas).

A precisão do método também foi avaliada pelo valor de HORRAT (AOAC, 2012; González, Herrador e Asuero, 2010), calculado pela Equação 4.4.

$$HORRAT = \frac{RSDpi}{PRSDR} \quad (\text{Equação 4.4})$$

Onde:

RSDpi: desvio padrão relativo das análises em dias diferentes;

PRSDR: desvio padrão relativo predito.

O desvio padrão relativo predito (PRSDr) foi calculado de acordo com Jain e Arnold (2007) pela Equação 4.5.

$$PRSD_R\% = 2C^{-0,15} \quad (\text{Equação 4.5})$$

onde:

C1 = concentração média de HMF no ensaio de precisão.

4.1.2.4.5. Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo estudo de ensaios de recuperação de acordo com as recomendações da ANVISA (2003) e de RIBANI et al. (2004), em que as amostras (branco da matriz) foram fortificadas com concentrações conhecidas de HMF em cinco níveis de concentração (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 mg L⁻¹) e cada nível de concentração foi injetado em duplicata.

As taxas de recuperação foram expressas em porcentagem de acordo com a Equação 4.6.

$$Rec (\%) = \frac{C1-C2}{C3} \quad (\text{Equação 4.6})$$

onde:

C1 = concentração do analito na amostra fortificada;

C2 = concentração do analito na amostra não fortificada;

C3 = concentração do analito adicionado à amostra.

4.1.2.5. Análise Estatística

Para verificar se existiam diferenças significativas entre os teores médios de HMF entre as amostras das etapas de fervura e de maturação (Tabela 4.4) foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores. Para identificar se haviam diferenças significativas entre as médias de cada nível dos dois fatores (Tabela 4.5), foi construído o gráfico de efeito principal e para constatar se ocorriam interações entre os fatores, foi plotado o gráfico de efeito de interação.

Toda a análise estatística aplicada neste trabalho foi realizada no nível de 95% de confiança utilizando o software estatístico *Minitab versão 16*.

4.2. Resultados e Discussão

No presente trabalho foi realizado um estudo de validação intralaboratorial do método de CLAE-UV, seguindo as recomendações de guias orientativos da ANVISA

(2003), AOAC (2012), INMETRO (2016), e NATA (2012) e de artigos da literatura sobre validação (ARAUJO (2009), RIBANI et al. (2004) e GONZÁLEZ et al. (2010)).

Para a validação do método foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: seletividade, linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão.

4.2.1. Seletividade

A seletividade do método foi avaliada através da comparação dos tempos de retenção do HMF observados nos cromatogramas da solução padrão de HMF ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$), das amostras das etapas de fervura (F) e de maturação (M).

Os tempos de retenção do HMF observados nos cromatogramas da solução padrão de HMF $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ (4,460 min), na solução da amostra branco da fervura (4,453 min) e na solução da amostra branco da maturação (4,450 min) foram similares sugerindo que não há outros compostos coeluinto com o HMF nas amostras analisadas das etapas da produção de cerveja (cromatogramas não apresentados). Na solução da amostra da maturação fortificada com o padrão de HMF $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 4.1) foi observado um tempo de retenção de 4,475 minutos também muito similar ao do padrão de HMF. Considerando esses resultados, o método cromatográfico proposto pode ser considerado seletivo para a análise das amostras investigadas.

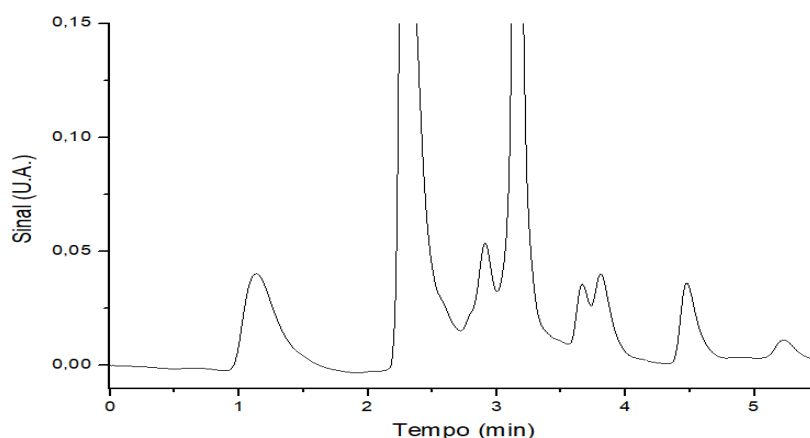


Figura 4.1. Cromatograma da amostra da maturação fortificada com padrão de HMF 2 mg/L .

A seletividade também foi avaliada pela comparação dos intervalos de confiança das inclinações das curvas analíticas de padrão externo e de adição de padrão nas amostras de fervura e de maturação (Figuras 4.2 e 4.3). Visualmente, observa-se a sobreposição das curvas analíticas de padrão externo e de adição de padrão na amostra da fervura

(Figura 4.2) e de padrão externo e adição de padrão na amostra de maturação (Figura 4.3). Estes resultados sugerem que não houve um efeito de matriz significativo na determinação do HMF, o que possibilita a utilização de curvas analíticas de padrão externo para a quantificação deste contaminante em cerveja.

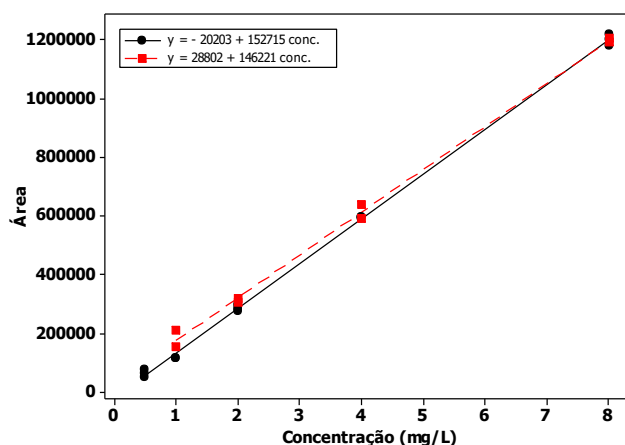


Figura 4.2. Curvas analíticas de padrão externo (linha preta) e de adição de padrão na amostra de fervura (linha vermelha) para determinação de HMF

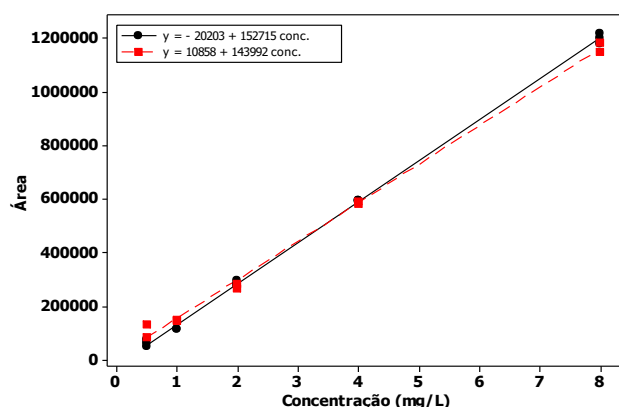


Figura 4.3. Curvas analíticas de padrão externo (linha preta) e de adição de padrão na amostra da maturação (linha vermelha) para determinação de HMF

O intervalo de confiança da inclinação da curva analítica de padrão externo foi igual a 152.715 ± 2.902 , da curva analítica de adição de padrão na amostra da fervura após processo de sonicação (branco da matriz) foi igual a 146.221 ± 7.326 e da curva analítica de adição de padrão na amostra da maturação após processo de sonicação (branco da matriz) foi igual a 143.992 ± 6.374 . A sobreposição destes intervalos de confiança confirma a análise visual de que não houve um efeito de matriz significativo, indicando que a padronização externa pode ser aplicada na determinação do HMF e que o método desenvolvido apresenta seletividade adequada.

4.2.2. Linearidade

O parâmetro da linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma determinada faixa de aplicação (RIBANI et al., 2004).

A linearidade do método de CLAE-UV foi verificada através da construção de uma curva analítica de padrão externo com soluções padrão de HMF na faixa de 0,5 a 8,0 mg L⁻¹. Aos dados experimentais foi aplicada a técnica de regressão linear no nível de 95 % de confiança e um teste de falta de ajuste, e os resultados são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Análise de regressão linear no nível de 95 % de confiança.

Regressão*		Falta de ajuste**		R	R ²
<i>F_{regressão}</i>	<i>valor de p</i>	<i>F_{faj}</i>	<i>valor de p</i>	1,000	99,9
13154,45	0,000	2,21	0,156		
Coeficientes da Reta de Regressão ± Erro Padrão				<i>t_{observado}</i> ***	<i>valor de p</i>
Intercepto: -20203 ± 5680				3,56	0,004
Inclinação: 152715 ± 1332				114,69	0,000

F_{crítico}* (0,05; 1,12) = 6,55; *F_{crítico}* (0,05; 3, 9) = 5,08; *** *t_{crítico}* (0,025;12) = 2,179

O coeficiente de correlação linear (*r*) da curva analítica foi igual a 1,000. Esse valor está dentro dos limites recomendados (*r* > 0,99) pela Anvisa (2003), e sugere uma possível linearidade.

O coeficiente de determinação (R²) é utilizado para verificar a qualidade do ajuste pelo modelo linear construído (FREIRE et al., 1999). O valor de R² foi igual a 99,9% e apenas 0,1% da variação foi explicada pelos resíduos apresentados na Tabela 4.1.

Com base nos valores de *r* e R², a curva analítica apresenta linearidade na faixa das concentrações investigadas de 0,5 a 8,0 mg L⁻¹. Essa hipótese foi confirmada com a aplicação de uma análise de variância da regressão linear no nível de 95 % de confiança e de um teste de falta de ajuste (*F_{faj}*) (ARAUJO, 2009; BARROS NETO, SCARMÍNIO e BRUNS, 2007).

Os resultados da análise de linearidade apontam que o modelo linear é apropriado, estabelecendo uma relação entre a área do pico cromatográfico do HMF e a concentração, com valores para *F_{faj}* não significativos no nível de 95 % de confiança (*p* > 0,05). Este fato também é verificado pelo valor do *F_{regressão}* altamente significativo (*p* = 0,000). A partir desses resultados, foi verificada a significância dos coeficientes da curva analítica

(intercepto e inclinação) com a aplicação de um *teste-t* sobre cada coeficiente no mesmo nível de confiança (Tabela 4.1). A análise do *teste-t* indicou que os dois coeficientes são significativos e podem ser inseridos no modelo.

Estes resultados são enfatizados pelos erros padrão apresentarem valores bem inferiores em relação aos valores de cada coeficiente. Desta forma, pode-se sugerir que a curva analítica de padrão externo é linear na faixa de concentrações estudada, não passa pela origem e pode ser representada por: Área = -20.203 + 152.715* concentração de HMF (mg L⁻¹) (Figura 4.4).

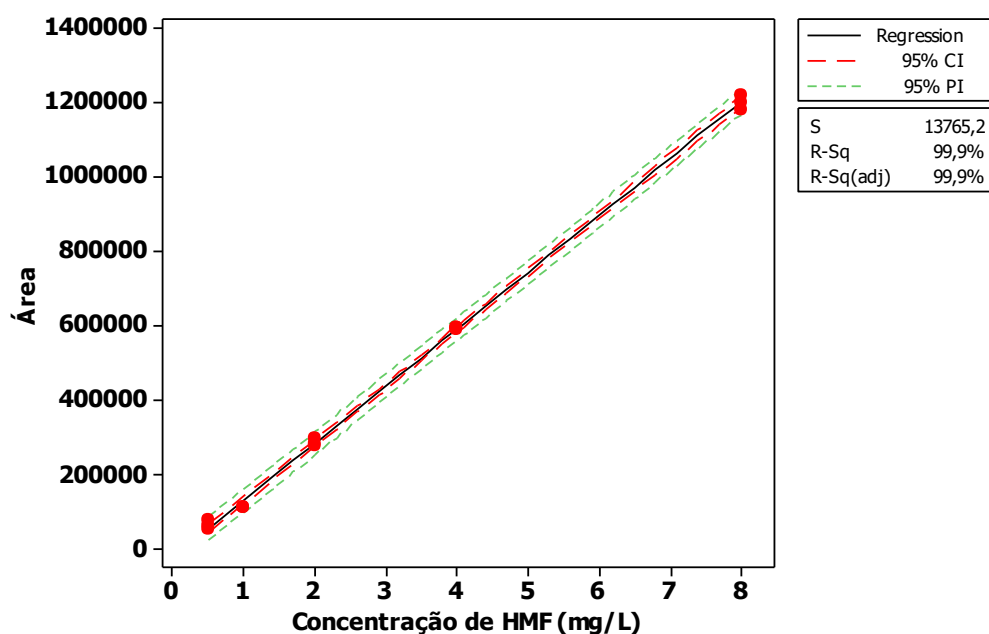


Figura 4.4. Gráfico da reta de regressão linear, intervalos de confiança (IC) e intervalos de predição (IP) a 95% de confiança para a curva analítica por CLAE-UV

4.2.3. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)

A estimação dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) é importante e assegura que o método cromatográfico em estudo permite a determinação de HMF em baixas concentrações nas amostras de cerveja.

Os valores de LD e de LQ calculados neste estudo foram de 0,112 mg L⁻¹ e 0,372 mg L⁻¹, respectivamente. Estes valores são superiores aos limites descritos na literatura que variaram num intervalo de 0,012 mg L⁻¹ e 0,036 mg L⁻¹ de acordo com CASTELLARI et al. (2001) e de 0,001 mg L⁻¹ e 0,0034 mg L⁻¹ segundo WU, SHI e FENG (2009). De acordo com Araújo (2009), os valores dos limites de detecção e de quantificação podem mudar em função do método adotado para sua estimação (relação sinal/ruído, desvio-

padrão dos brancos ou o método da curva analítica). Na literatura, os autores utilizaram o método da relação sinal/ruído ($S/R = 3$ para o LD e $S/R = 10$ para o LQ), o qual normalmente produz valores para os limites de detecção e de quantificação mais baixos do que o método da curva analítica. Considerando-se que para a quantificação de HMF faz-se o uso da curva analítica de padrão externo o método de cálculo que faz uso dos parâmetros da curva analítica seria o mais adequado, pois prevê os erros associados ao uso da mesma na estimação dos limites de detecção e de quantificação. De acordo com o INMETRO (2016), é importante que o limite de quantificação do método apresente um valor próximo ou igual ao primeiro ponto da curva analítica para garantir que os valores de LD e de LQ não tenham sido subestimados. Em nosso estudo, o limite de quantificação como já descrito anteriormente foi de $0,372 \text{ mg L}^{-1}$ e o primeiro ponto da curva foi igual a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Este resultado é concordante com as recomendações do INMETRO (2016).

4.2.4. Precisão

A precisão do método foi verificada em dois níveis pelo cálculo das estimativas de repetitividade e de precisão intermediária com relação ao tempo. Os resultados do estudo de precisão foram estimados de acordo com as recomendações da ANVISA (2003) e da AOAC (2012). Os valores de desvios padrão relativos (RSD %) para a repetitividade e para a precisão intermediária e o valor HORRAT são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Estimativas de repetitividade e de precisão intermediária e valor Horrat para o estudo da precisão.

RSD (%)			
Repetitividade	Precisão Intermediária	PRSDR	Horrat
1,39	8,58	13,89	0,62

Os valores de RSD (%) (Tabela 4.2) demonstraram que o método cromatográfico apresenta uma boa precisão para a análise de HMF em amostras de cerveja, considerando-se que os valores aceitáveis de RSD (%) segundo a ANVISA (2003) devem estar abaixo de 15 %.

Os valores de PRSDR e de Horrat foram iguais a 13,89 e 0,62, respectivamente. Dessa forma, estas estimativas foram consideradas adequadas de acordo com o limite aceitável segundo GONZÁLEZ; HERRADOR e ASUERO (2010) para a precisão de análises intralaboratoriais (inferior a 16 e 1,3, respectivamente). Este resultado indica que

o método proposto de CLAE-UV apresenta precisão intermediária adequada para a análise de HMF nas amostras das etapas de produção de cervejas investigadas.

Alguns trabalhos reportados por outros autores para a análise de HMF em cerveja apresentaram valores de repetitividade na faixa de 2,3 a 5,6 % e precisão intermediária na faixa de 3,7 a 6,7 % segundo WU, SHI e FENG (2009).

Os resultados para o estudo de precisão neste trabalho foram similares aos reportados na literatura para a estimativa de repetitividade. Porém, para a estimativa de precisão intermediária foram determinados maiores valores de RSD (%), o que pode estar relacionado com diferenças da matriz analisada em relação às cervejas investigadas pelos outros autores.

4.2.5. Exatidão

O parâmetro de exatidão foi avaliado por meio de ensaios de recuperação, sendo determinado de acordo com RIBANI *et al.* (2004) e ANVISA (2003). Os valores de taxas de recuperação de HMF expressos em porcentagem são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Taxas de recuperação (%) de HMF para as etapas de fervura e de maturação.

Amostras	% Recuperação				
	0,5 mg L ⁻¹	1,0 mg L ⁻¹	2,0 mg L ⁻¹	4,0 mg L ⁻¹	8,0 mg L ⁻¹
Fervura	96,8 ± 7,7	108,1 ± 2,7	110,5 ± 4,9	103,6 ± 4,7	99,9 ± 3,0
Maturação	96,2 ± 5,0	105,4 ± 0,8	96,4 ± 5,6	98,7 ± 0,4	97,4 ± 0,3

Os resultados indicam que o método proposto apresenta exatidão adequada, sendo os valores das taxas de recuperação para a fervura de 97-110 % e para a maturação de 96-105 %. Todas as taxas de recuperação se encontraram dentro dos limites aceitáveis que devem estar entre 80 e 110 % (AOAC, 2012; INMETRO, 2016).

Na literatura, alguns trabalhos apresentaram valores de taxas de recuperação para a análise de HMF em cerveja similares aos determinados neste estudo, na faixa de 95 a 96 % (LO COCO *et al.*, 1995), de 97,3 a 99,5 % (CASTELLARI *et al.*, 2001) e de 84,8 a 110,2 % (WU, SHI e FENG, 2009).

4.3. Aplicação do Método Validado de CLAE-UV às Amostras de Cerveja

Após a realização do estudo de validação pelo método de CLAE-UV para determinação de HMF em diferentes etapas de produção de cerveja, o mesmo foi aplicado a todas as amostras das etapas de fervura e de maturação coletadas na micro cervejaria, descritas no Capítulo 3. Os teores de HMF foram determinados em duplicata, sendo apresentados na **Tabela 4.4**.

Tabela 4.4. Teores médios e respectivos desvios padrão das amostras coletadas nas etapas de fervura e de maturação do processo de produção de cerveja lager

Amostras	Concentração HMF (mg/L) na Etapa de Fervura	Concentração HMF (mg/L) na Etapa de Maturação
1	0,757± 0,002	0,594± 0,002
2	0,680± 0,004	0,663± 0,029
3	0,932± 0,167	0,693± 0,045
4	0,867± 0,053	0,668± 0,040
5	0,885± 0,167	0,667± 0,009
6	0,612± 0,118	0,560± 0,057
7	0,735± 0,024	0,508± 0,033
8	0,539± 0,013	0,448± 0,051
9	0,537± 0,019	0,490± 0,020

Para verificar se havia influência das etapas de fervura e de maturação nos teores de HMF e da amostragem foi aplicada uma análise de variância de dois fatores aos teores de HMF no nível de 95% de confiança e os resultados são apresentados na **Tabela 4.5**.

Tabela 4.5. Análise de Variância de dois fatores para teor de HMF nas etapas de produção de cerveja lager

Fontes de Variação	g.l.	SQ	QM	F_{obs}	p -valor
Etapas	1	0,2617	0,26167	55,1*	0,000
Amostragem	8	0,6284	0,07855	16,5**	0,000
Interação	8	0,0921	0,01151	2,42**	0,033
Resíduo	36	0,1711	0,00475		
Total	53	1,1532			

* $F_{crítico}(0,05; 1,36) = 5,51$; ** $F_{crítico}(0,05; 8,36) = 2,60$

Os resultados indicam que existem diferenças significativas nos teores de HMF entre as etapas de fervura e de maturação ($F_{obs} = 55,1$; $p = 0,000$). Como ilustrado na Figura 4.5.1 observa-se uma redução nos teores de HMF entre as etapas de fervura e de maturação de $0,14 \text{ mg L}^{-1}$.

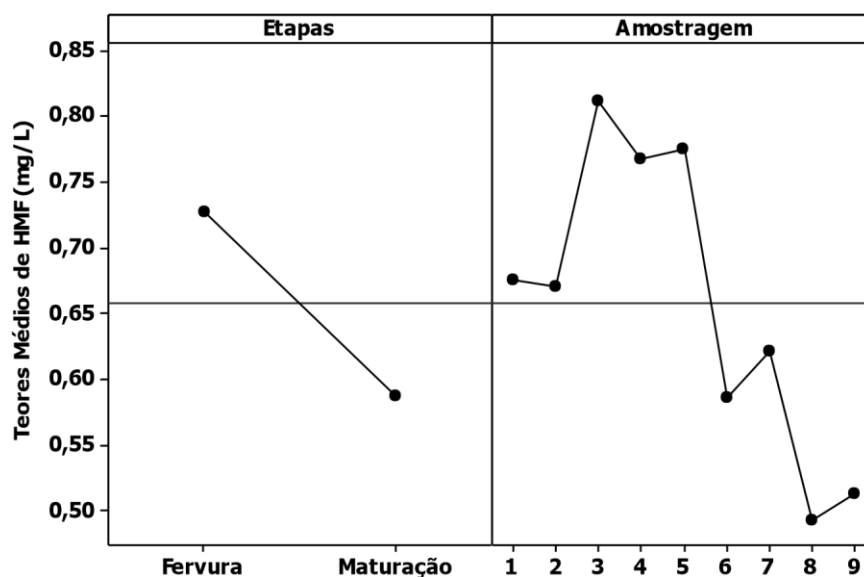


Figura 4.5.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos teores de HMF de cerveja lager.

A redução de HMF entre as etapas de fervura e de maturação pode ser explicada pelo fato da levedura metabolizar este contaminante durante o processo de fermentação transformando-o no composto identificado como o álcool 2,5-bis-hidroximetilfuranílico. De acordo com LIU et al. (2004) a levedura reduz o grupo aldeído do anel furano do HMF para o álcool correspondente.

As amostras coletadas para estas etapas do processo de fabricação de cerveja mostraram também diferenças significativas nos teores de HMF ($F_{obs} = 16,5$ com $p = 0,000$) como demonstrado na Figura 4.5.2. As variações nos teores de HMF podem estar relacionadas com as mudanças de matéria prima e de formulação bem como com os teores de açúcares presentes no malte, com os valores de pH das diferentes etapas e com as temperaturas utilizadas em cada etapa do processo.

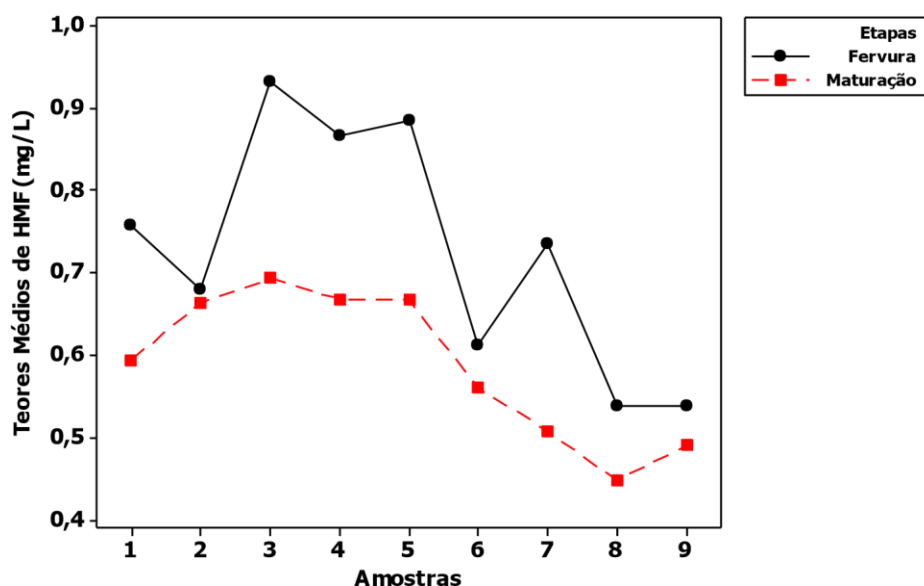


Figura 4.5.2. Gráfico de efeito de interação dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos teores de HMF de cerveja lager.

A análise da Figura 4.5.2 demonstra uma relação dos teores de HMF nas etapas de fervura e de maturação com a composição da matéria prima e formulação da cerveja produzida na Micro cervejaria. Para as amostras 1 e 2 produzidas com o lote A de malte tradicional foram obtidos valores de HMF similares na etapa de fervura. O mesmo comportamento é observado nas amostras 3, 4 e 5 produzidas com o lote B de malte tradicional e nas amostras 8 e 9 produzidas com o lote D de malte tradicional e com a maior proporção de malte ácido. De forma geral, as amostras produzidas somente com malte tradicional (amostras 1 a 5), exceto pela amostra 7 produziram teores de HMF mais altos do que as amostras 6, 8 e 9 em que parte do malte tradicional foi substituído pelo malte ácido. Com o objetivo de verificar se a formulação tem influência nos teores de HMF nas etapas de fervura e de maturação foram realizadas análises de correlação linear no nível de 95% de confiança entre as proporções de malte tradicional e de malte ácido com os valores de HMF determinados nas etapas de fervura e de maturação. Foram observadas correlações lineares positivas significativas entre os teores de HMF da etapa de fervura e a proporção de malte tradicional ($r = 0,822$; $p = 0,007$) e entre os teores de HMF da etapa de maturação e a proporção de malte tradicional ($r = 0,950$; $p = 0,000$). Em outras palavras, quanto maior a proporção de malte tradicional na formulação da cerveja maiores serão os valores de HMF nas etapas de fervura e de maturação. Este comportamento pode ser explicado considerando-se que nas amostras com maior

proporção de malte tradicional podem ser encontradas maiores proporções de açúcares e foram observados menores valores de pH na etapa de fervura (como já descrito anteriormente). É reconhecido na literatura que a composição e a proporção de açúcares e os valores de pH tem grande influência na formação deste contaminante (DE ANDRADE et al., 2016). Correlações lineares negativas significativas foram determinadas entre a proporção de malte ácido e os valores de HMF da etapa de fervura ($r = -0,753$; $p = 0,019$) e de proporção de malte ácido e os valores de HMF da etapa de maturação ($r = -0,932$; $p = 0,000$). Isto significa que com o aumento da proporção de malte ácido nas formulações há uma diminuição nos valores de HMF nas etapas de fervura e de maturação. É preciso ressaltar aqui que como já foi descrito anteriormente nas formulações que contem maior proporção de malte ácido foram observados valores mais baixos de pH na etapa de fervura mas valores mais altos de pH na etapa de maturação, sendo este um parâmetro muito importante para a formação deste contaminante. A análise de açúcares residuais nas etapas de fervura e de maturação poderá auxiliar na elucidação dos fatores que levam à formação de HMF nas amostras analisadas neste estudo.

Além destes efeitos foi observado também um efeito de interação significativo entre os fatores avaliados (etapas do processo de fabricação e amostragem) nos teores de HMF. Foi verificado na Figura 4.5.2 um comportamento similar de variação entre as amostras coletadas para as duas etapas do processo de fabricação (fervura e maturação). No entanto, os teores de HMF foram sempre mais baixos na etapa de maturação quando comparados com a etapa de fervura em todo o período avaliado.

4.4. Conclusões parciais

Os resultados obtidos neste estudo mostram que foi possível validar uma metodologia de CLAE-UV para determinação de HMF de maneira simples e rápida com injeção direta das amostras de diferentes etapas de produção de cerveja (fervura e maturação), com valores adequados de precisão e exatidão, linearidade, seletividade e limites de acordo com os encontrados na amostra. Além disso, os valores de HMF diferenciados observados entre as etapas de fervura e de maturação indicam que ocorreram diferenças na concentração deste contaminante decorrente das etapas de produção da cerveja lager. Outro fato observado é a influência da proporção de malte tradicional e de malte ácido bem como da acidez nos teores de HMF das amostras das etapas de fervura e de maturação.

4.5. Referências

ANALÍTICOS, M. DOQ-CGCRE-008. p. 31, 2016.

ANVISA. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Disponível em: <<http://bibliofarma.com/re-no-899-de-29-de-maio-de-2003/>>. Acesso em: 6 nov. 2017.

AOAC. Appendix J: AOAC INTERNATIONAL Methods Committee Guidelines for Validation of Microbiological Methods for Food and Environmental Surfaces. **Aoac Official Methods of Analysis**, p. 1–21, 2012.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation □. v. 877, p. 2224–2234, 2009.

BARROS NETO, B.; SCARMÍNIO, I. S. .; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na Ciência e na Indústria**. 3. ed. [s.l.] Unicamp, 2007.

CASTELLARI, M. et al. Determination of Carboxylic Acids , Carbohydrates , Glycerol , Ethanol , and 5-HMF in Beer by High-Performance Liquid Chromatography and UV – Refractive Index Double Detection. **Journal of Chromatographic Science**, v. 39, p. 235–238, 2001.

DE ANDRADE, J. K. et al. In house validation from direct determination of 5hydroxymethyl-2-furfural (HMF) in Brazilian corn and cane syrups samples by HPLCUV. **Food Chemistry**, v. 190, p. 481–486, 2016.

FREIRE, C. A. D. L. et al. **ANÁLISE DE MODELOS DE REGRESSÃO LINEAR**. Universida ed. São Paulo: [s.n.].

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1995–1998, 2010.

ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. **International Conference on Harmonization**, v. 1994, n. November 1996, p. 17, 2005.

LIU, Z. L. et al. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 8, p. 345–352, 2004.

LO COCO, F. et al. Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. **Analytica Chimica Acta**, v. 306, p. 57–64, 1995.

RIBANI, M. et al. VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

TSAL, W. H. et al. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and dispersive micro-solid-phase extraction for the determination of quinolones in swine muscle by high-performance liquid chromatography with diode-array detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1–2, p. 56–62, 2009.

WU, J. Y.; SHI, Z. G.; FENG, Y. Q. Determination of 5-hydroxymethylfurfural using derivatization combined with polymer monolith microextraction by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 3981–3988, 2009.

CAPÍTULO 5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CERVEJA

CAPÍTULO 5. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DA CERVEJA

Diante da preocupação das microcervejarias em estabelecer um controle de qualidade de seus produtos, torna-se necessário um acompanhamento durante as principais etapas da produção de cerveja, com emprego de análises físico-químicas com baixo custo e que apresentem bons resultados, como exemplo a aplicação de métodos clássicos e a utilização de métodos espectrofotométricos.

Entre os parâmetros físico-químicos citados na literatura e analisados com maior frequência para o controle de qualidade pode-se citar o pH, a acidez, a cor, o amargor e o grau alcoólico (GOIANA et al., 2016; BRUNELLI; MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014; CURI; VENTURINI e NOJIMOTO, 2009). A análise destes parâmetros é realizada normalmente pelos métodos padronizados pelo Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; PASCUET e TIGLEA, 2008) e pelo guia Analytica-EBC (BRUNELLI; MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014; COCUZZA e MITTER, 2009).

Assim, neste capítulo serão apresentados os resultados da análise dos parâmetros físico-químicos por métodos clássicos e pelo método espectrofotométrico padronizados, viabilizando um controle de qualidade nas etapas de produção de cerveja bem como, a aplicação de ferramentas estatísticas aos resultados obtidos.

5.1. Materiais e Métodos

5.1.1. Determinação de pH

As medidas de pH foram determinadas por um pHmetro de bancada Hanna modelo pH 21 de acordo com o método 168/IV descrito em Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBO; PASCUET e TIGLEA, 2008).

5.1.2. Determinação da Acidez Total

A acidez total foi determinada pelo método 221/IV descrito em Métodos FísicoQuímicos para Análise de Alimentos (ZENEBO; PASCUET e TIGLEA, 2008).

5.1.3. Álcool em peso a 20 °C ou grau alcoólico

Determinou-se a porcentagem de álcool em volume nas amostras de cerveja pelo método 247/IV descrito em Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos (ZENEBO; PASCUET e TIGLEA, 2008).

5.1.4. Determinação do amargor da cerveja

O amargor da cerveja foi determinado pelo método 8.8 da Analytica – EBC, o qual é recomendado pelo European Brewery Convention (BRUNELLI; MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014; COCUZZA e MITTER, 2009). As amostras foram previamente filtradas com papel filtro e descarbonatadas em banho de ultrassom por 16 minutos. Uma alíquota de 10,0 mL da amostra foi retirada e acidificada com 1,0 mL de ácido clorídrico 6,0 mol L⁻¹. Em seguida adicionou-se 20,0 mL de iso-octano e a mistura foi colocada sob agitação a 250 rpm durante 15 min no Shaker, extraindo os compostos amargos do mosto (etapa da fervura) e da cerveja (etapa da maturação) acidificada para o iso-octano. A emulsão formada foi centrifugada em 4000 rpm durante 5 min. A amostra foi transferida para cubeta de quartzo com 10 mm de percurso ótico e foi realizada a medida espectrofotométrica na região do ultravioleta a 275 nm. O amargor das amostras foi expresso em unidades de amargor (UA), sendo este valor calculado segundo a Equação 5.1.

$$Amargor_{UA} = Ab_{275\text{ nm}} \times 50 \quad (\text{Equação 5.1})$$

Onde:

Ab é a absorvância em comprimento de onda de 275 nm;

UA é a unidade de medida de amargor.

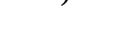
5.1.5. Determinação da cor da cerveja

De acordo com a Analytica-EBC (ANGELONI, 2016) a análise de cor foi realizada considerando as leituras no espectrofotômetro UV-VIS a 430 nm em cubeta de quartzo com caminho optico de 1,0 cm, segundo a Equação 5.2:

$$EBC\ Cor = A_{430\text{ nm}} \times 25 \quad (\text{Equação 5.2})$$

A classificação foi realizada de acordo com a **Tabela 5.1**.

Tabela 5.1. Classificação de cor da cerveja de acordo com a Analytica-EBC

Cor	Estilo de Cerveja	SRM	EBC	Coloração observada
Água	-	0	0	
Amarelo-palha	Lite American Lager, Berliner Weisse	2-3	4-6	
Amarelo	German Pilsner	3-4	6-8	
Dourado	Dortmunder Export	5-6	10-12	
Âmbar	Maibock / Helles Bock	6-9	12-18	
Cobre-claro	California Common Beer	10-14	20-28	
Cobre	Dusseldorf Altbier, Roggenbier	14-17	28-33	
Marrom-Claro	Roggenbier	17-18	33-35	
Marrom	Southern English Brown Ale	19-22	37-43	
Marrom-escuro	Robust Porter, Oatmeal Stout	22-30	37-59	
Marrom muito escuro	Sweet Stout	30-35	59-69	
Preto	Foreign Extra Stout	35+	69	
Preto opaco	Russian Imperial Stout	40+	79	

*SRM (Standard Reference Method) **EBC (European Brewing Convention). Fonte: Modificado de (BEERBIER, 2013).

5.2. Resultados e Discussão

5.2.1. Análises Físico-Químicas

Em todas as amostras coletadas foram realizadas as caracterizações físicoquímicas de pH, acidez total, amargor, cor e grau alcóolico considerando-se as principais etapas do processo de fabricação da cerveja, ou seja, brassagem, fervura, fermentação e maturação. As coletas das amostras foram realizadas quinzenalmente ou semanalmente durante um período de quatro meses de acordo com o fluxograma de fabricação da Micro Cervejaria correspondendo a nove amostras, como já descrito no Capítulo 3.

Para as etapas de brassagem e de fervura em cada coleta, as amostras foram obtidas em dois períodos (manhã e tarde) totalizando dezoito amostras. Análises estatísticas apontaram para a ausência de diferenças entre os valores obtidos das amostras coletadas no período da manhã e da tarde. Os resultados obtidos para cada parâmetro físico-químico das amostras das etapas de brassagem e de fervura nos períodos da manhã e da tarde foram muito similares entre si para as nove amostras coletadas. Em vista disso, as médias de cada período (manhã e tarde) foram aplicadas na análise estatística dos resultados dos parâmetros físico-químicos pH, acidez total e amargor das etapas de

brassagem e de fervura. Os valores foram expressos como médias e desvios padrão e são apresentados nas **Tabelas 5.2, 5.4, 5.6 e 5.8**.

5.2.2. Influência das etapas de fabricação de cerveja (brassagem, fervura, fermentação e maturação) nos valores de pH

Os valores de pH das amostras das etapas de produção de cerveja na Micro Cervejaria são apresentados na **Tabela 5.2**.

Tabela 5.2. Valores médios de pH das etapas de produção de cerveja lager na Micro Cervejaria

Amostras	Etapas de Produção de Cerveja			
	Brassagem*	Fervura*	Fermentação*	Maturação*
1	6,06	6,12	4,34	4,34
2	6,07	6,17	4,30	4,33
3	6,02	5,99	4,35	4,29
4	5,99	6,01	4,45	4,27
5	6,00	6,02	4,26	4,25
6	5,78	5,80	4,43	4,36
7	5,67	5,62	4,63	4,43
8	5,66	5,70	4,48	4,53
9	5,67	5,70	4,43	4,50

*Os respectivos desvios padrões para todas as medidas foram de 0,01, correspondente ao desvio padrão instrumental.

Para verificar se havia influência das etapas de fabricação da cerveja lager (brassagem, fervura, fermentação e maturação) e de amostragem nos valores de pH foi aplicada uma análise de variância de dois fatores no nível de 95% de confiança e os resultados são apresentados na **Tabela 5.3**.

Tabela 5.3. Análise de Variância de dois fatores para influência das etapas de produção de cerveja nos valores de pH

Fontes de Variação	g.l.	SQ	QM	F _{obs}	p-valor
Etapas	3	40,8	13,6	15374,6*	0,000
Amostragem	8	0,2	0,03	29,0**	0,000
Interação	24	1,3	0,06	62,7***	0,000
Resíduo	36	0,03	0,0009		
Total	71	42,4			

* $F_{crítico(0,05; 3,36)} = 2,92$; ** $F_{crítico(0,05; 8,36)} = 2,27$; *** $F_{crítico(0,05; 24,36)} = 1,84$

Os resultados da ANOVA indicam que existem diferenças significativas nos valores de pH entre as etapas de produção de cerveja na Micro Cervejaria ($F_{obs} = 15374,6$ com $p = 0,000$). Como ilustrado na **Figura 5.1.1** observa-se que a variação nos valores de pH entre as etapas de brassagem e de fervura se mantem na faixa de 5,88 a 5,90 e entre as etapas de fermentação e de maturação na faixa de 4,41 a 4,37. Entre as etapas de fervura e de fermentação há uma diminuição nos valores de pH de 1,49 unidades.

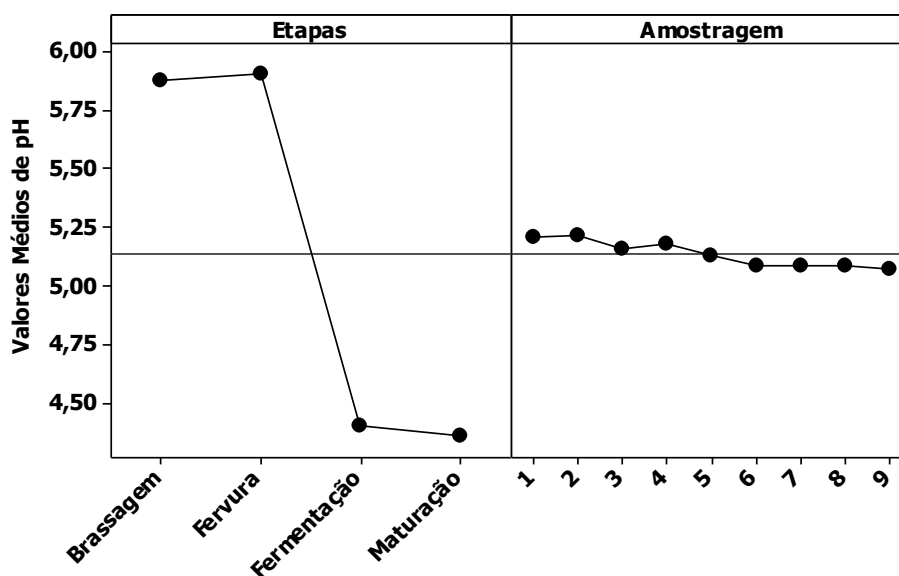


Figura 5.1.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção de cerveja (brassagem (1), fervura (2), fermentação (3) e maturação (4) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de pH de cerveja lager.

A etapa de brassagem é mais eficiente quando os valores de pH estão na faixa de 5,4 a 5,6 para β -amilase e 5,6 a 5,8 para α -amilase; essas enzimas são responsáveis pela decomposição do amido em maltose e dextrinas (WYLER, 2013). As amostras 1 a 5 (Tabela 5.2) mostraram valores de pH acima da faixa ideal (5,99 a 6,07), indicando que a água usada no processo estava com excesso de alcalinidade (KUCK, 2008). O pH inicial da água utilizada no processo de fabricação da Micro Cervejaria estava variando de 9,5 a 10,5 (informação obtida de laudos técnicos), sendo que o valor de pH ideal da água usada para a produção de cerveja deve estar na faixa de 6,5 a 7,0. Foi realizada uma modificação na receita original da cerveja produzida (amostras 6 a 9) com a adição de um malte ácido (que contém de 1 a 2% de ácido láctico) (WECKL, 2016). Então foi possível observar que a partir da amostra 6 os valores de pH se situaram entre 5,66 a 5,78 e estão mais próximos dos que são considerados ótimos para atuação das enzimas que participam dos processos de produção da cerveja.

É importante ressaltar que se a água utilizada no processo cervejeiro possuir alcalinidade em excesso durante a lavagem do bagaço do malte poderá ocorrer uma diminuição da concentração dos minerais cálcio e magnésio, a possibilidade de extração de substâncias amargas, a remoção inadequada de polifenóis do malte e a redução da atividade enzimática e extração de cor (KUCK, 2008).

Na etapa da fervura os valores de pH devem se situar na faixa de 5,3 a 5,5 (PINTO et al., 2016). Esses valores de pH otimizam a reação de isomerização dos α -ácidos, a solubilização dos compostos presentes no lúpulo e o desenvolvimento de cor pela caramelização dos açúcares e pela reação de Maillard (SIQUEIRA, BOLINI e MACEDO, 2008), e ao final dessa etapa tem grande influência na coagulação das proteínas (PINTO et al., 2016). A remoção deficiente das proteínas ao final da etapa de fervura pode afetar a redução do diacetil (2,3-butanodiona) (que pode ser formado durante a etapa de fermentação), provocar uma redução do amargor na cerveja pela diminuição do rendimento da reação de isomerização dos α -ácidos, além de ser fundamental para garantir uma boa estabilidade da cerveja produzida (CASTRO e SERRA, 2012). Todas as amostras analisadas apresentaram valores de pH acima do valor ideal (5,62 a 6,17) (Tabela 5.2) para esta etapa de produção de cerveja, tornando-se necessária a realização de uma correção dos valores de pH para se obter uma melhor eficiência na etapa de fervura e posteriormente na fermentação. No entanto, a partir da amostra 6 observa-se que os valores de pH (5,62 a 5,80) se aproximaram mais do valor ideal de pH nesta etapa de produção de cerveja.

Já na etapa de fermentação os valores de pH precisam estar na faixa de 4,5 a 5,5 para melhorar a eficiência da levedura (ALVES, 2014). Como foi observado anteriormente os valores de pH ao final da fervura (5,62 a 6,17) estão acima do valor de pH ideal para iniciar o processo fermentativo, sendo necessária uma correção deste parâmetro físico-químico para aumentar a eficiência desta etapa.

Os valores de pH das amostras analisadas da etapa da fermentação (Tabela 5.2) (4,26 a 4,63) estão próximas do pH final da cerveja. Neste estudo foi observada uma redução de 1,49 unidades nos valores de pH entre as etapas de fervura e de fermentação. Este comportamento pode ser explicado considerando-se que ao final da fermentação os valores de pH sofrem uma redução em relação aos valores observados nas etapas anteriores devido à formação de alguns ácidos orgânicos como ácido acético, ácido

propanóico, ácido butanóico, ácido pentanóico, ácido octanóico, ácido láctico, ácido pirúvico e ácido succínico que são responsáveis pela redução dos valores de pH entre as etapas de fervura e de fermentação (ALVES, 2014; DE ALMEIDA, 2006; CARNEIRO, 2016).

Na etapa de maturação os valores de pH devem estar na faixa de 4,0 a 5,0 sendo que valores de pH mais baixos melhoram a estabilidade da espuma e valores de pH acima de 4,5 podem favorecer o desenvolvimento de outros micro-organismos (BRUNELLI, MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014; SLEIMAN, 2002; GOIANA et al., 2016; BUHALI et al., 2016; DE ALMEIDA, 2006). Neste estudo, as amostras oriundas da etapa de maturação 1 a 5 que foram produzidas sem a adição de pequenas proporções de malte ácido apresentaram valores de pH mais baixos (4,25 a 4,34) e inferiores a 4,50 demonstrando que estes valores propiciam uma melhora da estabilidade da espuma. As amostras 8 e 9 que tinham em sua formulação maior proporção de malte ácido mostraram valores de pH em torno de 4,5 (Tabela 5.2). Em vista destes resultados, pode-se sugerir que nesta etapa do processo de produção de cerveja, todas as amostras apresentaram valores de pH dentro do recomendado na literatura.

O gráfico dos efeitos principais referente à análise de variância de dois fatores ilustrado na Figura 5.1.1 mostra que existe um efeito muito significativo das etapas de produção de cerveja nos valores de pH. No entanto, a variação de pH entre as amostras foi pequena, indicando que apesar das mudanças de matéria prima e de formulação (Tabela 3.1) não houve variações muito acentuadas nos valores médios de pH em cada etapa do processo produtivo de cerveja.

Os valores médios de pH das amostras coletadas durante o processo de produção de cerveja na Micro Cervejaria estão apresentados no gráfico de efeito de interação ilustrado na Figura 5.1.2.

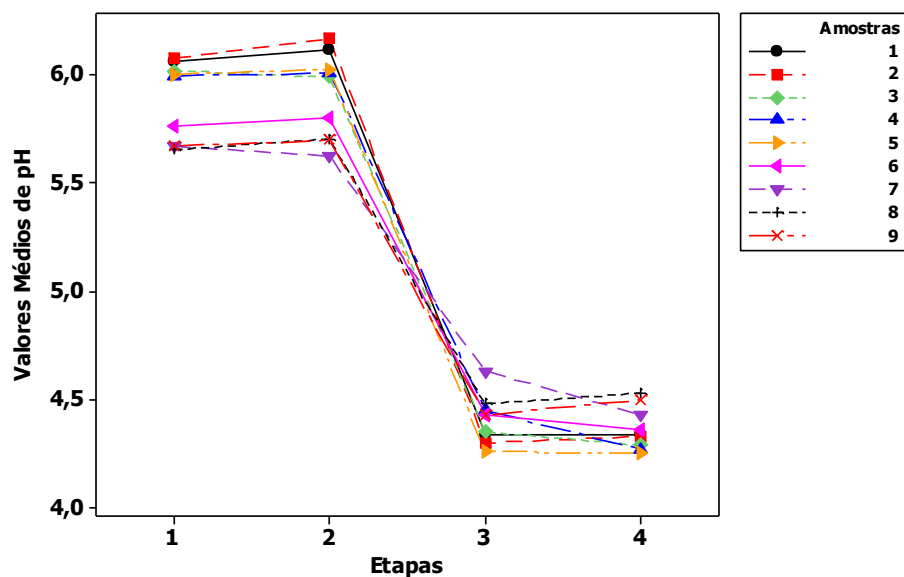


Figura 5.1.2. Gráfico do efeito de interação dos fatores etapas de produção de cerveja (brassagem (1), fervura (2), fermentação (3) e maturação (4) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de pH de cerveja lager.

O gráfico do efeito de interação (Figura 5.1.2) sugere que há similaridade entre as etapas de brassagem e de fervura e entre as etapas de fermentação e de maturação com relação ao parâmetro físico-químico investigado. Foram observados valores de pH mais baixos nas duas últimas etapas em relação às duas primeiras.

Em relação às amostras coletadas se observa que as variações de pH entre as quatro etapas estão relacionadas às mudanças de matéria prima e de formulação (Tabela 3.1). As amostras 1 e 2 apresentaram valores similares de pH entre as etapas e foram fabricadas com o lote de malte tradicional A adicionado em proporções similares na formulação destas amostras. O mesmo comportamento é observado nas amostras 3, 4 e 5 e estas foram produzidas com o lote B de malte e em proporções similares às adotadas para as amostras 1 e 2. A partir da amostra 6 foi observado um comportamento diferenciado nos valores de pH em relação às amostras 1 a 5. A partir da amostra 6 há uma diminuição nos valores de pH das etapas de brassagem e de fervura e um leve aumento nos valores de pH nas etapas de fermentação e de maturação. Esses resultados podem ser explicados por mudanças nos lotes de malte tradicional (lote C para as amostras 6 e 7 e lote D para as amostras 8 e 9) e pela adição em concentrações crescentes de malte ácido, com conseqüente redução do malte tradicional nas formulações 6 a 9

como mostrado na Tabela 3.1. Nas amostras 8 e 9 também foi alterado o lote de lúpulo (lote B) em relação às demais amostras (lúpulo lote A).

Para verificar se havia influência das proporções de malte tradicional e de malte ácido adicionado nos valores de pH das amostras analisadas entre as quatro etapas do processo produtivo de cerveja foram realizadas análises de correlação linear no nível de 95% de confiança. Foram observadas correlações lineares negativas significativas entre a proporção de malte ácido e os valores do pH da etapa de brassagem ($r = -0,983$; $p = 0,000$), entre a proporção de malte ácido e os valores de pH da etapa de fervura ($r = -0,950$; $p = 0,000$), entre a proporção de malte ácido e os valores de pH da etapa de maturação ($r = -0,949$; $p = 0,000$) indicando que quando aumenta a proporção de malte ácido nas formulações há uma diminuição dos valores de pH nestas etapas. De maneira inversa foram observadas correlações lineares positivas significativas entre a proporção de malte tradicional adicionado e os valores de pH das etapas de brassagem ($r = 0,958$; $p=0,000$), de fervura ($r = 0,898$; $p = 0,001$), de fermentação ($r = 0,749$; $p = 0,020$) e de maturação ($r = 0,909$; $p = 0,001$) nas amostras investigadas. Estes resultados demonstram que o tipo de malte utilizado, bem como a proporção adotada na formulação tem grande influência nos valores de pH de todas as etapas do processo de fabricação de cerveja.

5.2.3. Influência das etapas de fabricação (brassagem, fervura, fermentação e maturação) nos valores de acidez

Os valores de acidez das amostras das etapas de produção de cerveja são apresentados na **Tabela 5.4**.

Tabela 5.4. Valores médios de acidez (mEq/L) e respectivos desvios padrão das etapas de produção de cerveja na Micro Cervejaria

Amostra	Etapas de Produção Cerveja			
	Brassagem	Fervura	Fermentação	Maturação
1	22,64±0,62	13,92±0,95	19,04±1,0	25,28±1,82
2	21,76±1,21	13,12±0,48	22,26±1,54	26,24±1,46
3	22,32±0,68	16,00±0,48	25,44±1,27	29,28±1,73
4	22,32±0,68	13,92±1,08	22,26±0,92	20,83±0,39
5	20,72±0,86	13,29±0,93	22,00±0,75	21,08±0,52
6	24,60±0,72	14,16±0,95	25,17±0,63	24,50±1,15
7	24,16±0,81	13,77±1,10	25,25±1,09	29,50±1,09
8	22,83±0,11	14,92±0,31	23,53±0,24	19,75±0,66
9	21,20±0,14	14,08±0,14	21,44±0,37	21,83±0,76

Para verificar se havia influência das etapas de brassagem, fervura, fermentação e maturação na acidez da cerveja lager produzida na Micro Cervejaria e da amostragem foi aplicada uma análise de variância de dois fatores aos valores de acidez no nível de 95 % de confiança e os resultados são apresentados na **Tabela 5.5**.

Tabela 5.5. Análise de Variância de dois fatores para acidez (mEq/L) em cerveja lager

Fontes de Variação	g.l.	SQ	QM	F _{obs}	p-valor
Etapas	3	1725,2	575,1	858,5*	0,000
Amostragem	8	238,6	29,8	44,5**	0,000
Interação	24	283,2	11,8	17,6***	0,000
Resíduo	72	48,2	0,7		
Total	107	2295,3			

* $F_{crítico}(0,05; 3,72) = 3,32$; ** $F_{crítico}(0,05; 8,72) = 2,39$; *** $F_{crítico}(0,05; 24,72) = 1,86$

Os resultados indicam que existem diferenças significativas nos valores de acidez entre as etapas de produção de cerveja ($F_{obs} = 858,5$ com $p = 0,000$). Como ilustrado na Figura 5.2.1 observa-se uma redução nos valores de acidez entre as etapas de brassagem e fervura de 8,5 mEq/L.

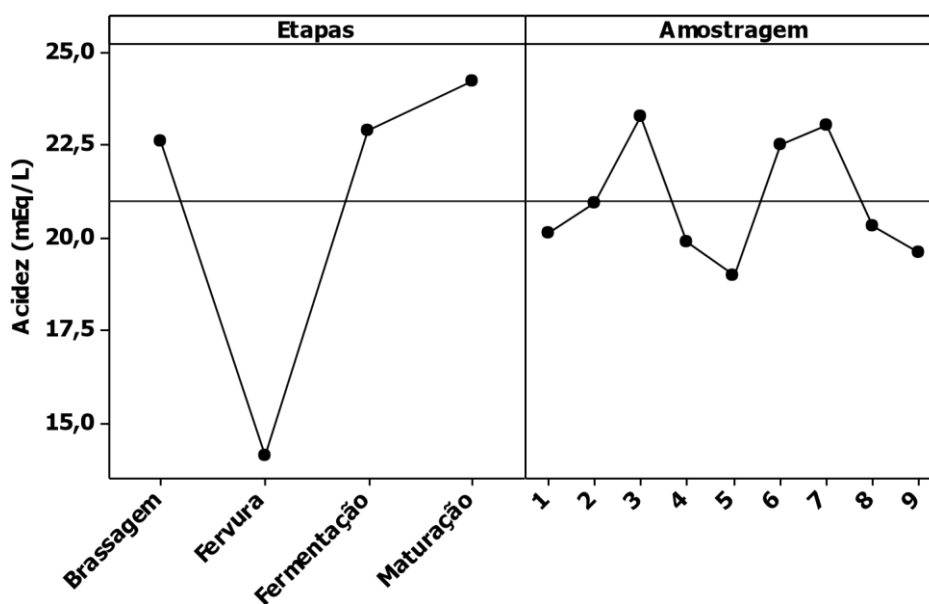


Figura 5.2.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção de cerveja (brassagem, fervura, fermentação e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de acidez de cerveja lager.

O mosto inicial que corresponde às etapas de brassagem e de fervura contém a maioria dos ácidos provenientes do malte, que podem sofrer variações durante o seu processamento (CARNEIRO, 2016). Na etapa de brassagem pode-se observar na Figura

5.2.1, valores de acidez que podem estar relacionadas aos ácidos presentes no malte. Posteriormente, ocorre uma redução da acidez ao final da etapa de fervura que pode ser relacionada com a remoção do *trub* quente; este resíduo é constituído principalmente de proteínas correspondendo a aproximadamente 70 % em massa, e os outros 30 % desse resíduo são derivados de compostos como polifenóis, minerais, compostos não solúveis do lúpulo, carboidratos e ácidos graxos (MATHIAS MELLO e SERVULO, 2014).

Entre as etapas de fervura e de fermentação há novamente um aumento da acidez de 8,8 mEq/L e entre as etapas de fermentação e de maturação há uma leve elevação da acidez de 1,3 mEq/L. Os valores de acidez observados nas amostras da etapa de fermentação podem ser provenientes da formação de ácidos orgânicos como o ácido acético e o ácido fórmico (BRUNELLI, MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014). Esses ácidos são responsáveis pela elevação da acidez na etapa de fermentação como podemos observar na Figura 5.2.1. Durante a fermentação ocorre também a formação de ésteres, resultado da reação entre álcoois e ácidos carboxílicos (ácido acético) através do metabolismo da levedura, os quais podem afetar os valores de acidez nesta etapa de produção da cerveja (ROSA e AFONSO, 2015; BRAGA, 2006).

As amostras coletadas para as etapas do processo de fabricação de cerveja mostraram também diferenças significativas (Tabela 5.5) nos valores de acidez ($F_{obs} = 44,5$ com $p = 0,000$) como ilustrado na Figura 5.2.1.

Além destes efeitos foi observado também um efeito de interação significativo entre os fatores avaliados (etapas do processo de fabricação e amostragem) nos valores de acidez. Como ilustrado na Figura 5.2.2 foi observado um comportamento similar para a acidez entre as amostras coletadas para as etapas de brassagem (valores de acidez entre 20,24 e 25,12 mEq/L) e de fermentação (valores de acidez entre 19,04 e 25,25 mEq/L). Na etapa de fervura houve maior variação entre os valores de acidez (11,67 a 16,48 mEq/L) nas amostras coletadas quando comparadas aos valores de acidez das demais etapas.

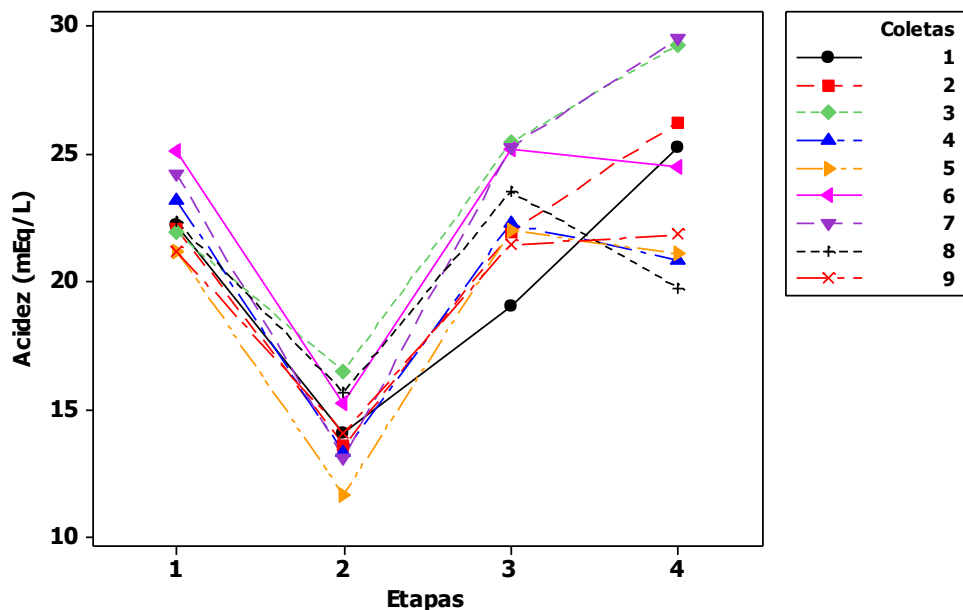


Figura 5.2.2. Gráfico de efeito de interação dos fatores etapas de produção (brassagem (1), fervura (2), fermentação (3) e maturação (4)) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de acidez de cerveja lager.

O gráfico de efeito de interação entre as etapas de produção e amostragem sugere que entre as etapas de brassagem e de fervura há um comportamento similar nos valores de acidez entre as amostras, sendo que os valores de acidez reduzidos na etapa de fervura foram recuperados durante a etapa da fermentação com valores de acidez próximos aos da etapa da brassagem. Uma diferenciação com relação à acidez foi observada entre as etapas de fermentação e de maturação em relação as amostras analisadas

Houve um aumento de acidez (situando-se na faixa de 3,84 a 6,24 mEq L⁻¹) entre as etapas de fermentação e de maturação nas amostras 1, 2, 3 e 7 e uma diminuição da acidez (situando-se na faixa de 0,66 a 3,77 mEq L⁻¹) nas amostras 4, 5, 6 e 8. A amostra 9 sofreu um pequeno aumento de acidez igual a 0,39 mEq L⁻¹. Uma possível explicação para esse comportamento é que esses valores de acidez podem ser aumentados ou diminuídos pela conversão de ácidos orgânicos em ésteres (CARNEIRO, 2016; BRUNELLI, MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014; ROSA e AFONSO, 2015; BRAGA, 2006).

5.2.4. Influência das etapas de fabricação (Fervura, Maturação) nos valores de amargor

Para a avaliação do amargor foram realizadas análises deste parâmetro físico-químico somente nas etapas de fervura e de maturação. Isto se justifica pelo fato do lúpulo, ingrediente que confere o sabor amargo à cerveja, ser adicionado somente na etapa de fervura. As substâncias amargas extraídas podem sofrer transformações ou serem perdidas durante a etapa de fermentação e por isso, os valores de amargor são novamente avaliados na etapa de maturação, visando obter-se uma melhor compreensão do processo produtivo com relação a este parâmetro físico-químico. Os valores de amargor das etapas de fervura e de maturação referentes às amostras coletadas são apresentados na **Tabela 5.6**.

Tabela 5.6. Valores médios de amargor e respectivos desvios padrão das etapas de produção de cerveja (fervura e maturação) na Micro Cervejaria

Amostra	Etapas de Produção de Cerveja	
	Fervura (IBU)	Maturação (IBU)
1	26,71±1,62	12,55±0,18
2	24,05±0,29	11,58±0,10
3	26,94±0,65	12,78±0,08
4	27,71±0,21	12,40±0,13
5	23,69±0,65	11,33±0,08
6	22,38±0,22	10,38±0,10
7	24,52±0,81	11,23±0,15
8	18,60±0,15	9,10±0,09
9	20,10±0,18	9,30±0,05

Para verificar se havia influência das etapas de fervura e de maturação nos valores de amargor da cerveja lager produzida na Micro Cervejaria e de amostragem foi aplicada uma análise de variância de dois fatores aos valores de amargor no nível de 95% de confiança e os resultados são apresentados na Tabela 5.7.

Tabela 5.7. Análise de Variância de dois fatores para os valores de amargor em cerveja lager.

Fontes de Variação	g.l.	SQ	QM	F _{obs}	p-valor
Etapas	1	2031,4	2031,4	51.864,5*	0,000
Amostragem	8	222,3	27,79	709,4**	0,000
Interação	8	37,4	4,67	119,2**	0,000
Resíduo	36	1,41	0,04		
Total	53	2292,4			

*F_{crítico}(0,05; 1,36) = 5,51; **F_{crítico}(0,05; 8,36) = 2,60

Os resultados indicam que existem diferenças significativas nos valores de amargor entre as etapas de fervura e de maturação ($F_{obs} = 51.864,5$ com $p = 0,000$). Como ilustrado na Figura 5.3.1 observa-se uma redução média maior que 50% nos valores de amargor entre as etapas de fervura e de maturação. As diferenças nos valores de amargor entre as etapas de fervura e de maturação podem ser geradas durante a fermentação do mosto, onde no início da fermentação ocorre a formação de gás carbônico, que transporta as substâncias amargas até a parte superior do líquido e estas acabam sendo perdidas nas paredes dos tanques (LAWS, MCGUINNESS e RENNIE, 1972; BRUNELI, MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014).

Os valores de amargor também podem sofrer uma redução na etapa de fervura quando a reação de isomerização dos alfa ácidos for incompleta. Além desses fatores, as substâncias amargas podem ser absorvidas nos poros da levedura, e ao final da fermentação quando essas leveduras precipitam, provocam perdas de amargor. A diminuição do pH na fermentação pela formação de ácidos orgânicos também afeta os valores de amargor (POPESCU et al., 2013).

Na etapa da fervura o lúpulo é adicionado para conferir amargor à cerveja, onde os α -ácidos são convertidos em iso- α -ácidos pela reação de isomerização. Esta reação tem rendimento de apenas 30% devido ao fato de valores de pH menores não favorecerem a reação de isomerização (DOS SANTOS, 2013). Como já descrito no item

5.2.2 o intervalo de pH ideal para a isomerização dos α -ácidos presentes no lúpulo e responsáveis pelo amargor da cerveja é de 5,3 a 5,5 na etapa de fervura. A **Figura 5.2.2.** ilustra o esquema da reação de isomerização dos α -ácidos.

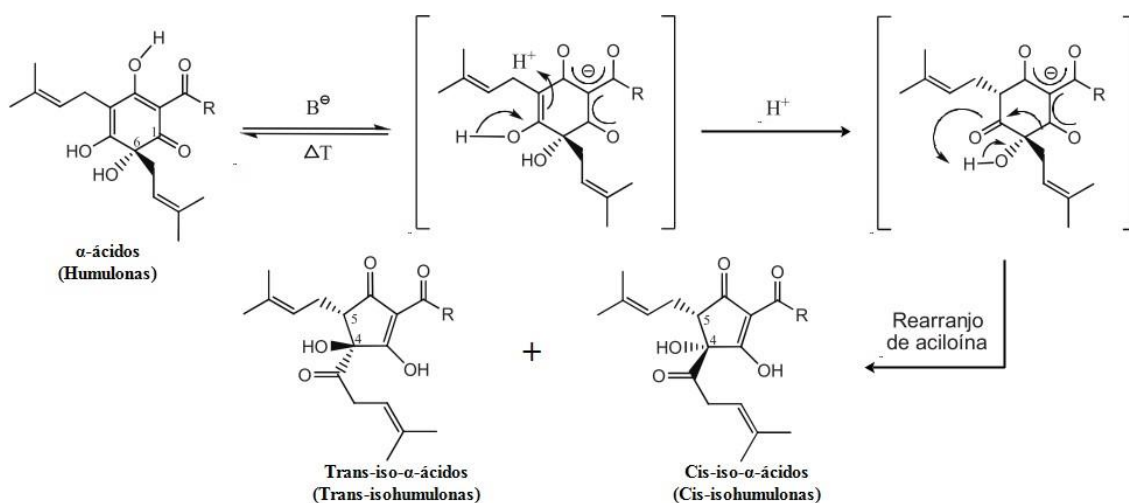


Figura 5.2.2. Esquema da Reação de Isomerização dos α -ácidos. Adaptado de (DE ALMEIDA, 2011)

Como já mencionado, os α -ácidos, compostos que apresentam baixa solubilidade em meio aquoso (60 mg L^{-1} a 100°C), são convertidos em iso- α -ácidos, espécies solúveis nesta temperatura. Essa conversão resulta em diastereoisômeros cis-iso- α -ácidos e trans-iso- α -ácidos na proporção de 68 e 32 %, respectivamente. Estes diastereoisômeros possuem como característica principal um anel de cinco membros em sua estrutura. Ainda existem outras moléculas responsáveis por gerar amargor porém em menor intensidade, com a substituição dos radicais nas moléculas cis/trans-iso- α -ácidos, apresentados na **Tabela 5.8** (DE ALMEIDA, 2011).

Tabela 5.8. Diferentes compostos geradores de amargor na cerveja.

α -ácidos	Radical (R)	%
Humulona	$\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	35-70
Cohumulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	20-65
Adhumulona	$\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$	10-15
Préhumulona	$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$	1-10
Posthumulona	CH_2CH_3	1-3

Fonte: Adaptado de VARNAN e SUTHERLAND (1997).

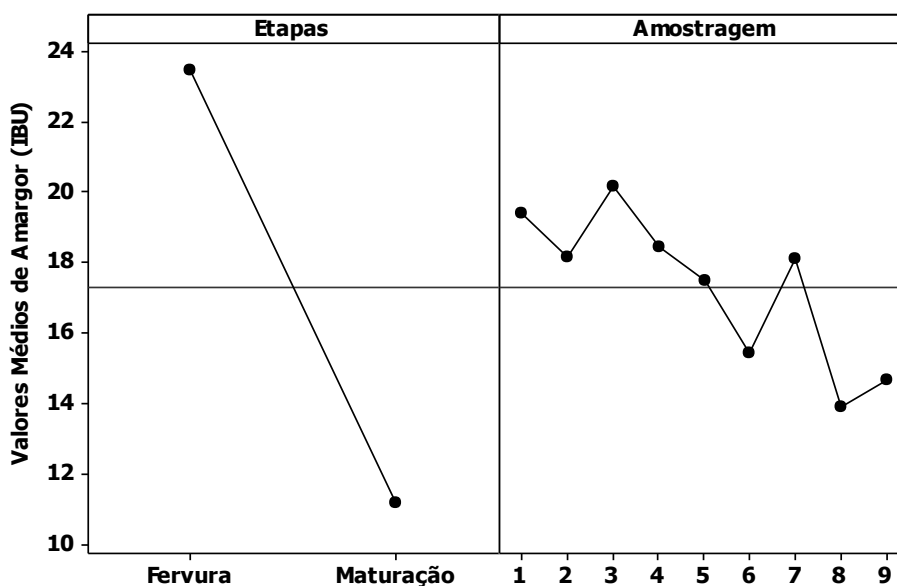


Figura 5.3.1. Gráfico de efeitos principais dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de amargor de cerveja lager.

As amostras coletadas para estas etapas do processo de fabricação de cerveja mostraram também diferenças significativas nos valores de amargor ($F_{obs} = 709,4$ com $p = 0,000$) como demonstrado na Figura 5.3.1. De maneira geral, as amostras 1 a 5 e a

amostra 7 produziram valores de amargor maiores do que os observados nas amostras 6, 8 e 9.

Os valores de amargor nas diferentes amostras podem ser afetados pela utilização de lotes diferentes de lúpulo. Nas amostras analisadas neste trabalho foi utilizado o lote de lúpulo A (Tabela 3.1) nas amostras 1 a 7, as quais mostraram valores mais altos de amargor nas etapas estudadas (22,38 a 27,71 IBU na etapa de fervura e 10,38 a 12,78 IBU na etapa de maturação) e o lote de lúpulo B nas amostras 8 e 9 as quais apresentaram valores mais baixos de amargor (18,60 a 20,10 IBU na etapa de fervura e 9,10 a 9,30 IBU na etapa de maturação). Estas diferenças entre as amostras também podem estar relacionadas com o rendimento da reação de isomerização dos α ácidos que podem sofrer influência do pH do mosto, não sendo favorável em valores de pH mais ácidos (CASTRO e SERRA, 2012). Para verificar se havia influência dos valores de pH da etapa de fervura nos valores de amargor das etapas de fervura e de maturação foram realizadas análises de correlação linear no nível de 95% de confiança entre estas variáveis. Foram observadas correlações lineares positivas significativas entre os valores de pH da etapa de fervura (Tabela 5.2) e os valores de amargor da etapa de maturação (Tabela 5.6) ($r = 0,718$; $p = 0,029$) e entre os valores de amargor da etapa de fervura e os valores de pH da etapa de fervura ($r = 0,630$; $p = 0,000$). Estes resultados sugerem que os valores de pH da etapa de fervura têm grande influência nos valores de amargor das etapas de fervura e de maturação.

Além destes efeitos foi observado também um efeito de interação significativo entre os fatores avaliados (etapas do processo de fabricação e amostragem) nos valores de amargor (Figura 5.3.2).

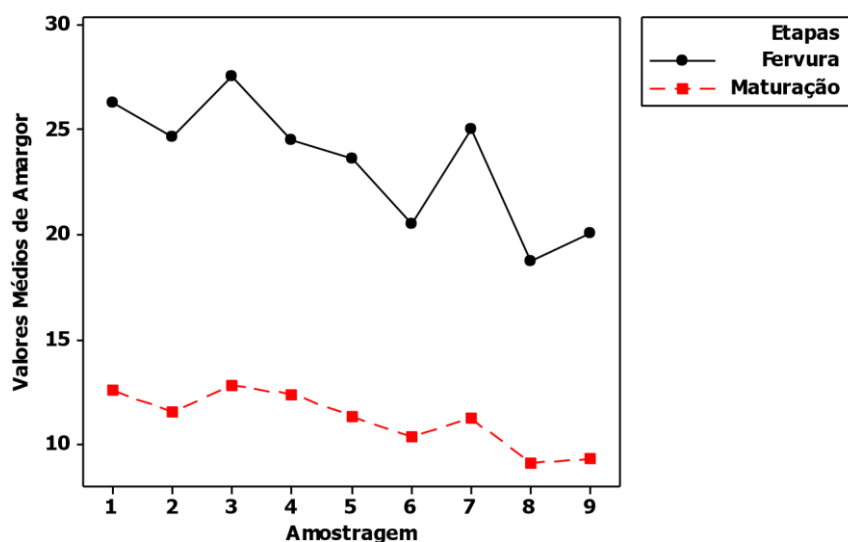


Figura 5.3.2. Gráfico de efeito de interação dos fatores etapas de produção (fervura e maturação) e amostragem (amostras 1 a 9) nos valores de amargor de cerveja lager.

Foi verificado na Figura 5.3.2 um comportamento similar de variação no parâmetro físico-químico amargor entre as amostras coletadas para as duas etapas do processo de fabricação (fervura e maturação). No entanto, os valores de amargor foram sempre mais baixos na etapa de maturação quando comparados com a etapa de fervura em todo o período avaliado. Tal comportamento é esperado, uma vez que o amargor naturalmente decresce durante o processo de produção como observado por (POPESCU et al., 2013).

É preciso também levar em consideração que cada estilo de cerveja produzido possui valores de amargor distintos, no caso de cervejas lager esses valores variam na faixa de 8 a 40 IBU (BONACCORSI, 2016), sendo que cervejas brasileiras estilo pilsen (lager) geralmente possuem valores entre 8-20 IBU.

5.2.5. Influência da etapa de maturação na composição físico-química da cerveja

Na etapa de maturação a cerveja já se encontra praticamente pronta para a comercialização. Em vista disso, nas amostras desta etapa do processo produtivo foram analisados vários parâmetros físico-químicos que são normalmente adotados para garantir a qualidade da cerveja consumida. Na Tabela 5.8 são apresentados os valores das análises físico-químicas realizadas nas amostras da etapa de maturação do processo de produção de cerveja na Micro Cervejaria.

Tabela 5.8. Análise físico-química das amostras coletadas na etapa de maturação da produção de cerveja na Micro cervejaria

Amostra	pH*	Acidez Total (mEq/L) *	Cor (EBC) *	Grau Alcoólico (%)*	Amargor (IBU) *
1	4,34±0,01 ^{c,d}	25,28±0,19 ^b	6,34±0,04 ^d	5,40±0,04 ^a	12,55±0,18 ^{a,b}
2	4,33±0,01 ^{c,d}	25,60±0,25 ^{a,b}	6,62±0,05 ^c	5,10±0,05 ^{c,d}	11,58±0,10 ^c
3	4,29±0,01 ^{d,e}	29,28±0,18 ^a	8,22±0,03 ^a	5,23±0,03 ^b	12,78±0,08 ^a
4	4,27±0,01 ^e	20,87±0,11 ^d	6,68±0,06 ^{b,c}	5,21±0,04 ^{b,c}	12,40±0,13 ^b
5	4,25±0,01 ^e	21,08±0,10 ^d	6,73±0,15 ^{b,c}	5,18±0,05 ^{b,c}	11,33±0,08 ^{c,d}
6	4,36±0,01 ^c	24,50±0,23 ^{b,c}	6,78±0,16 ^{b,c}	4,97±0,05 ^e	10,38±0,10 ^e
7	4,43±0,01 ^b	29,50±0,22 ^a	6,87±0,04 ^b	5,15±0,02 ^{b,c,d}	11,23±0,15 ^d
8	4,53±0,01 ^a	19,75±0,13 ^d	5,42±0,04 ^e	5,06±0,03 ^{d,e}	9,10±0,09 ^f
9	4,50±0,01 ^a	21,83±0,15 ^{c,d}	5,25±0,03 ^e	5,21±0,06 ^b	9,30±0,05 ^f

*Médias com letras iguais não diferem estatisticamente no nível de 95% de confiança.

As amostras da etapa de maturação do processo de produção de cerveja (Tabela 5.8) apresentaram valores de pH que se situaram entre 4,25 a 4,53. Na literatura, valores de pH menores para a cerveja oriunda da etapa de maturação são recomendados pois tem ação na estabilidade da espuma e na estabilidade microbiológica, como já descrito anteriormente no item 5.2.2. No entanto, observam-se diferenças nos valores de pH das amostras analisadas. Para investigar se estas diferenças nos valores de pH eram significativas uma análise de variância de um fator no nível de 95% de confiança foi aplicada aos valores de pH das amostras coletadas na etapa de maturação (Tabela 5.8) e verificou-se que existem diferenças significativas entre as amostras pois o valor do $F_{obs} = 99,25$ com $p = 0,000$ é maior que o valor do $F_{crítico(8,9; 0,05)} = 3,23$. A aplicação de um teste de comparação múltipla de médias de *Tukey* no mesmo nível de confiança indicou que as amostras da etapa de maturação 8 e 9 tem valores de pH mais altos (4,50 - 4,53) em relação as demais amostras (1 a 7). As amostras 8 e 9 também apresentaram os valores de pH mais baixos nas etapas de brassagem e de fervura (Tabela 5.2). A amostra 7 mostrou valores de pH (4,63) que diferem de todas as demais. As amostras 1, 2 e 6 não apresentaram diferenças significativas nos valores de pH (4,33 - 4,36). Esses resultados podem ser explicados considerando-se que os valores de pH das amostras de maturação podem ser influenciados por alguns fatores como o pH do mosto e pelos ácidos formados durante a etapa de fermentação (GOIANA et al., 2016).

Em vista disso, uma análise de correlação linear no nível de 95 % de confiança foi realizada utilizando-se os dados das tabelas 5.2 e 5.8. Foi observada uma análise de correlação linear negativa significativa ($r = -0,859$, $p = 0,003$) entre os valores de pH das amostras das etapas de brassagem e de maturação e uma correlação linear negativa

significativa ($r = -0,773$, $p = 0,014$) entre os valores de pH das amostras das etapas de fervura e de maturação. Este resultado demonstra que quanto menores forem os valores de pH das etapas de brassagem e de fervura maiores serão os valores de pH da etapa de maturação. Da mesma forma, uma análise de correlação linear entre os valores de pH das etapas de fermentação e de maturação foi realizada e não foi observada uma correlação linear significativa entre estas etapas ($r = 0,588$; $p = 0,096$). Estes fatos indicam que os valores de pH da etapa de maturação são mais influenciados pelo pH do mosto (que corresponde as etapas de brassagem e de fervura) do que pelo efeito dos ácidos formados durante a etapa de fermentação. Por outro lado, as diferenças nos valores de pH das amostras da etapa de maturação podem estar relacionadas às mudanças de lote de matéria prima e de formulação.

Uma análise de variância de um fator no nível de 95% de confiança foi aplicada aos dados de acidez (Tabela 5.8) da etapa de maturação e verificou-se que existem diferenças significativas entre as amostras 1 a 9, pois o valor de $F_{obs} = 28,81$ com $p = 0,000$ é maior do que o valor de $F_{crítico}(8,18; 0,05) = 2,45$. A aplicação de um teste de comparação múltipla de médias de *Tukey* no mesmo nível de confiança indica que as amostras coletadas na etapa de maturação 2, 3 e 7 apresentaram os maiores valores de acidez (25,60 - 29,50 mEq L⁻¹). As amostras 1, 2 e 6 possuem valores de acidez semelhantes entre si com valores intermediários. As amostras 4, 5, 8 e 9 apresentaram os menores valores de acidez (19,75- 21,83 mEq L⁻¹). Estes resultados podem ser justificados considerando-se que os valores de acidez da etapa de maturação são influenciados pela formação de ácidos orgânicos durante a fermentação através do metabolismo das leveduras, e este parâmetro físico-químico pode sofrer variações pela conversão desses ácidos orgânicos em ésteres durante a etapa de fermentação e na etapa de maturação (KUCK, 2008).

Uma análise de variância de um fator no nível de 95% de confiança foi aplicada aos dados de grau alcoólico (Tabela 5.8) da etapa de maturação e verificou-se que existem diferenças significativas entre as amostras 1 a 9, pois o valor de $F_{obs} = 28,00$ com $p = 0,000$ é maior do que o valor do $F_{crítico} (8,18; 0,05) = 2,45$. A aplicação de um teste de comparação múltipla de médias de *Tukey* no mesmo nível de confiança indica que a amostra 1 tem valor de grau alcoólico mais alto (5,40) e é diferente em relação as demais amostras. As amostras 3, 4, 5, 7 e 9 possuem valores similares de grau alcoólico (5,15 - 5,23). As amostras 2, 4, 5 e 7 possuem valores semelhantes de grau alcoólico (5,10-5,21). As amostras 6 e 8 apresentaram os menores valores de grau alcoólico (4,97 e 5,06). As

diferenças observadas nos valores de grau alcoólico dependem da quantidade de açúcares presentes no mosto que provocam variações no metabolismo da levedura (DA SILVA et al., 2009). Uma melhor avaliação da influência da composição da matéria prima e da formulação neste parâmetro físico-químico poderá ser realizada a partir da análise dos teores de açúcares no mosto e nas amostras da etapa de fermentação. Todas as amostras analisadas apresentaram valores de grau alcóolico dentro do recomendado pela literatura em cervejas lager que é de 3 a 8% (ARAÚJO, SILVA e MINIM, 2003).

Uma análise de variância de um fator no nível de 95% de confiança foi aplicada aos dados de cor (Tabela 5.8) da etapa de maturação e verificou-se que existem diferenças significativas entre as amostras coletadas 1 a 9, pois $F_{obs} = 331,35$ com $p = 0,000$ é maior que o valor do $F_{crítico} (8,18; 0,05) = 2,45$. A aplicação de um teste de comparação múltipla de médias de Tukey no mesmo nível de confiança indica que a amostra coletada da maturação 3 apresenta o valor de cor mais alto (8,22) e é diferente das demais amostras. As amostras 2, 4, 5, 6 e 7 apresentaram valores de cor semelhantes (6,68 a 6,87) e a amostra 1 é diferente de todas as amostras. As amostras 8 e 9 apresentaram os menores valores de cor (5,25 e 5,42). Apesar das variações estatísticas encontradas, segundo o guia internacional de estilos de cerveja BJCP (STRONG e ENGLAND, 2015) a cor das cervejas *lager* pode variar na escala EBC na faixa de 6 a 8. Utilizando essa classificação apenas a amostra 3 possui coloração fora da escala recomendada. Este resultado pode estar relacionado a uma reação de Maillard mais intensa devido a uma temperatura mais elevada adotada durante a etapa de fervura. As demais variações de cor observadas nas amostras podem ser resultado da modificação da formulação e da matéria prima, visto que a cor depende diretamente do extrato primitivo e de diferenças na quantidade de compostos fenólicos presentes no malte. Além disso, a casca do malte também pode conter substâncias que colaboram para o desenvolvimento da cor (BRUNELI, MANSANO e VENTURINI FILHO, 2014).

Para verificar se havia uma relação entre a formulação e a cor das amostras da etapa de maturação foi realizada uma análise de correlação linear no nível de 95% de confiança. Uma correlação linear positiva significativa entre a proporção de malte tradicional e a cor das amostras de maturação ($r = 0,636$; $p = 0,000$) foi observada, demonstrando que quanto maior a proporção de malte tradicional adicionado na formulação maior será a cor da amostra resultante da etapa de maturação. Desse modo, pode-se avaliar essas diferenças como naturais do processo cervejeiro em micro cervejarias, com exceção da amostra 3. A classificação da cor da cerveja na legislação

brasileira apresenta apenas valores na escala EBC abaixo de 20 para cervejas claras, ou acima de 20 para cervejas escuras (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2009). A cor da cerveja também é afetada pela quantidade de ácidos formados na fermentação, sendo que uma maior quantidade de ácidos implica em cervejas mais claras (KUCK, 2008). Sendo assim, uma análise de correlação linear no nível de 95% de confiança também foi aplicada aos dados de pH da etapa de maturação e de cor (Tabela 5.8). Uma correlação linear negativa significativa ($r = -0,721$; $p = 0,029$) foi observada sugerindo que quando as amostras da etapa de maturação apresentam valores de pH mais baixos mostram maior intensidade de cor.

Uma análise de variância de um fator no nível de 95% de confiança foi aplicada aos dados de amargor (Tabela 5.8) da etapa de maturação e verificou-se que existem diferenças significativas entre as coletas 1 a 9, pois o valor do $F_{obs} = 458,57$ com $p = 0,000$ é maior que o valor do $F_{crítico(8,18; 0,05)} = 2,45$. A aplicação de um teste de comparação múltipla de médias de Tukey no mesmo nível de confiança indica que as amostras 1 e 3 possuem valor de amargor mais altos (12,55 e 12,78) em comparação com as demais amostras. As amostras 1 e 4; 2 e 5; 5 e 7 possuem valores de amargor semelhantes entre si (11,23 a 12,55). A amostra 6 possui valor de amargor diferente de todas as amostras (10,38). As amostras 8 e 9 apresentaram os menores valores de amargor (9,10 e 9,30). Esses valores de amargor foram menores devido à maior quantidade de malte ácido usado durante a etapa da brassagem e que forneceram valores menores de pH na etapa da fervura, na qual o lúpulo é adicionado. Outro fator responsável pela diminuição do amargor foi a troca do lote de lúpulo para as amostras 8 e 9 (lote B) em relação as amostras 1 a 7 (lote A). Como já descrito anteriormente, os valores de pH das etapas de fervura e de maturação podem ter grande influência nos valores de amargor. Para verificar se havia uma relação entre os valores de pH e os valores de amargor foi realizada uma análise de correlação linear no nível de 95% de confiança. Uma correlação linear positiva significativa entre os valores de pH da etapa de fervura e de amargor da etapa de maturação ($r = 0,717$; $p = 0,030$) demonstrou que quanto maiores forem os valores de pH da etapa de fervura mais altos serão os valores de amargor. Uma análise de correlação linear negativa significativa entre os valores do pH de maturação e os valores de amargor ($r = -0,827$; $p = 0,006$) também foi observada sugerindo que valores de pH mais baixos na etapa de maturação resultam em valores mais altos de amargor.

5.4. Conclusões parciais

Os resultados obtidos neste estudo na avaliação da qualidade físico-química realizada pela aplicação de testes estatísticos sugeriram diferenças significativas em todas as etapas do processo de produção de cerveja *lager* e entre as nove amostras coletadas na micro cervejaria. Estas diferenças podem ser explicadas pela alcalinidade da água utilizada na fabricação da cerveja, pelas mudanças de lote de matéria prima, as quais são mais frequentes em micro cervejarias e pelas alterações da formulação. De forma geral, as amostras da etapa de maturação mostraram uma qualidade físico-química que está dentro dos intervalos recomendados pela literatura para cerveja *lager*.

5.5. Referências

ALMEIDA, N. E. C. DE. **Reatividade de iso- α -ácidos e seus derivados hidrogenados frente ao radical 1-hidroxietila: implicações na perda de qualidade sensorial da cerveja.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

ALVES, L. M. F. **Análise Físico-Química de Cervejas Tipo Pilsen Comercializadas em Campina Grande na Paraíba.** [s.l.] Universidade Estadual da Paraíba, 2014.

ANGELONI, L. H. P. ” **Cerveja envelhecida em barril de madeira , aspectos químicos e microbiológicos.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. PERFIL SENSORIAL E COMPOSIÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE CERVEJAS PROVENIENTES DE DOIS SEGMENTOS DO MERCADO BRASILEIRO 1. v. 23, n. 2, p. 121–128, 2003.

BEERBIER. **Entendendo a Coloração da Cerveja.** Disponível em: <<https://www.beerbier.com.br/blog/entendendo-a-coloracao-da-cerveja/>>. Acesso em: 5 fev. 2018.

BONACCORSI, M. M. **Bjcp 2015Bjcp**, 2016.

BRAGA, V. S. **A Influência da Temperatura na Condução de Dois Processos Fermentativos para Produção de Cachaça.** [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006.

BRUNELI, L. T.; MANSANO, A. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização físico-química de cervejas elaboradas com mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 19–27, 2014.

BRUNELLI, L. T.; MANSANO, A. R.; VENTURINI FILHO, W. G. Caracterização Físico-Química de Cervejas Elaboradas com Mel. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 1, p. 19–27, 2014.

BUHALI, B. et al. Adição de fruta em formulação de cerveja. **Cervecon**, v. 1, n. 1, p. 7, 2016.

CARNEIRO, R. S. **Elaboração de Cerveja Artesanal Estilo Saison Ale Contendo Tamarindo**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2016.

CASTRO, M. P. DE; SERRA, S. G. **Comparação de Quatro Marcas de Cervejas Brasileiras**. [s.l.] Universidade do Vale do Paraíba, 2012.

COCUZZA, S.; MITTER, W. Use of Isomerized Hop Extract as a Replacement for Conventional Hop Extract and Its Influence on Beer Flavor. **MBAA Technical Quarterly**, v. 46, n. 2, p. 1–3, 2009.

CURI, R.; VENTURINI, W.; NOJIMOTO, T. Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte: análises físico-química e sensorial. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 2, p. 106–112, 2009.

DA SILVA, A. E. et al. Elaboração de Cerveja com Diferentes Teores Alcoólicos Através de Processo Artesanal. **Alimentos e Nutrição**, v. 20, n. 3, p. 369–374, 2009.

DE ALMEIDA, C. I. R. **Métodos Espectroscópicos para o Estudo da Cerveja**. [s.l.] Universidade de Aveiro, 2006.

DOS SANTOS, D. C. **Uma Revisão sobre o Amargor da Cerveja, suas Causas e Quantificação**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

GOIANA, M. L. et al. **Análises Físico-Químicas de Cervejas Artesanais Pale Ale Comercializadas em Fortaleza, Ceará**. XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos. **Anais...** Gramado: FAURGS, 2016

KUCK, L. S. **Cerveja : Sabor e Aroma**. [s.l.] Universidade Federal de Pelotas, 2008.

LAWS, D. R. J.; MCGUINNESS, J. D.; RENNIE, H. the Losses of Bitter Substances During Fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 78, n. 4, p. 314–321, 1972.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M. DE; SERVULO, E. F. C. Caracterização De Resíduos Cervejeiros. **Cobeq**, p. 8, 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, P. E A. **Decreto 6871/2009**. Disponível em: <<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=recuperarTextoAtoTematicaPortal&codigoTematica=1265102>>.

PINTO, M. B. C. et al. Alterações Físico-químicas Durante o Processo de Fermentação da Cerveja. **Cervecon**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2016.

POPESCU, V. et al. A study of beer bitterness loss during the various stages of the Romanian beer production process. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 111–115, 2013.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A Química da Cerveja. **Química Nova na Escola**, v. 37, n. 2, p. 98–105, 2015.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO, G. A. O Processo de Fabricação da Cerveja e Seus Efeitos na Presença de Polifenóis. **Alim. Nutr.**, v. 19, n. 4, p. 491–498, 2008.

SLEIMAN, M. **Produção de Cerveja com Extrato de Malte nas Formas de Xarope e Pó: Análise Físico-Química, Sensorial e Energética**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2002.

STRONG, G.; ENGLAND, K. **Beer Judge Certification Program 2015 Style Guidelines** **Beer Judge Certification Program**, 2015. Disponível em: https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf

WECKL, A. **Agrária Malte**. Disponível em: http://www.beerplanet.com.br/downloads/BeerPlanet-Palestra_MaltesAlexander_Weckl.pdf>. Acesso em: 6 nov. 2017.

WYLER, P. **Influência da Madeira de Carvalho na Qualidade da Cerveja Piracicaba**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2013.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. Bebidas alcoólicas. In: **Métodos FísicoQuímicos para Análise de Alimentos**. 4ª ed. [s.l: s.n.]. p. 409–64.

CAPÍTULO 6. CONCLUSÃO

CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram realizados o estudo de validação de uma metodologia por CLAE-UV para a determinação de HMF e a caracterização físico-química em amostras das etapas de produção de cerveja de uma micro cervejaria da região de GuarapuavaPR. Além disso, foram utilizadas diferentes ferramentas estatísticas na avaliação dos resultados obtidos.

O estudo de validação demonstrou através de diferentes técnicas estatísticas, que a metodologia de CLAE-UV para determinação de HMF foi validada de maneira simples e rápida, com injeção direta das amostras de diferentes etapas da produção de cerveja, apresentando valores adequados de precisão e exatidão e com limites de detecção e de quantificação de acordo com os encontrados na literatura. Este método proposto teve como vantagens a rapidez da análise e a não aplicação de qualquer tipo de preparo de amostra, podendo ser aplicado em análises de rotina para o controle de qualidade em amostras de cervejas.

A avaliação da qualidade físico-química realizada pela aplicação de testes estatísticos sugeriu diferenças significativas em todas as etapas do processo de produção de cerveja lager e entre as nove amostras coletadas na micro cervejaria. Estas diferenças podem ser explicadas pela alcalinidade da água utilizada na fabricação da cerveja, pelas mudanças de lote de matéria prima, as quais são mais frequentes em micro cervejarias e pelas alterações da formulação. De forma geral, as amostras da etapa de maturação mostraram uma qualidade físico-química que está dentro dos intervalos recomendados pela literatura para cerveja lager.

CAPÍTULO 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

CAPÍTULO 7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A realização deste estudo permitiu a validação de uma nova metodologia analítica para determinação de HMF em amostras de diferentes etapas da fabricação de cerveja, além disso, foram aplicados testes estatísticos na avaliação da qualidade físico-química de cervejas produzidas em micro cervejaria. Com base neste trabalho, é possível sugerir o desenvolvimento de novas pesquisas aplicadas ao controle de qualidade, tais como:

- ✓ Desenvolver e validar uma nova metodologia cromatográfica para a determinação de açúcares em amostras das diferentes etapas de produção de cerveja fazendo uso de diferentes ferramentas estatísticas;
- ✓ Desenvolver e validar uma nova metodologia cromatográfica para a determinação de compostos voláteis simultaneamente em amostras das diferentes etapas de produção de cerveja.

ANEXOS

ANEXOS

O Anexo A mostra as informações completas da Tabela 3.1, relacionadas as amostras das etapas de produção de cerveja, contendo a codificação das amostras, data de fabricação, condições de coleta, lote da matéria prima e formulações.

Anexo A. Informações referentes à amostragem na micro cervejaria.

Amostra	ID	Data de Fabricação	Condição de coleta	Lote da Matéria Prima	Formulação (%)		
1	B1 Manhã	14/03/17	H: 10:35; Tc: 64°; Ta: 24°	Malte A	Valor Original		
	B1 Tarde	14/03/17	H: 15:50; Tc: 68°; Ta: 29°	Malte A			
	FV1 Manhã	14/03/17	H: 12:58; Tc: 74°; Ta: 27°	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FV1 Tarde	14/03/17	H: 18:12; Tc: 71°; Ta: 28°	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FT1	21/03/17	H: 19:45; Tc: 4,5°; Ta:20°; T: 10	GrLv 5			
	M1	08/04/17	H: 19:51; Tc: 1,4°; Ta:20°; T: 10				
2	B2 Manhã	16/03/17	H: 09:37; Tc: 68°; Ta: 24°	Malte A	-0,36 m.	Média malte: -0,18	
	B2 Tarde	16/03/17	H: 14:53; Tc: 68°; Ta: 23°	Malte A	Valor original		
	FV2 Manhã	16/03/17	H: 12:07; Tc: 82°; Ta: 28°	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FV2 Tarde	16/03/17	H: 17:21; Tc: 80°; Ta: 23°	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FT2	23/03/17	H: 14:50; Tc: 4,7°; Ta:22°; T: 1	GrLv 6			
	M2	13/04/17	H: 11:42; Tc: 1,3°; Ta:21°; T:1				
3	B3 Manhã	13/04/17	H: 10:05; Tc: 67°; Ta:20°	Malte: B	Valor Original		
	B3 Tarde	13/04/17	H: 15:57; Tc: 68°; Ta:25°	Malte: B			
	FV3 Manhã	13/04/17	H: 13:06; Tc: 84°; Ta:24°	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FV3 Tarde	13/04/17	H: 18:25; Tc: 85°; Ta:23°	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FT3	22/04/17	H: 10:20; Tc: 4,5°; Ta:20° T: 10	GrLv 1			
	M3	03/05/17	H: 14:30; Tc: 1,2°; Ta:19°; T: 10				
4	B4 Manhã	22/04/17	H: 10:38; Tc: 69°; Ta: 20°	Malte B	-0,36 m.	Média malte: -0,18	
	B4 Tarde	22/04/17	H: 15:45; Tc: 68°; Ta:23°	Malte B	Valor original		
	FV4 Manhã	22/04/17	H: 13:05; Tc: 81°; Ta:23°C	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FV4 Tarde	22/04/17	H: 18:36; Tc: 82°; Ta:21°	Lp Amargor A; Lp Aroma A			
	FT4	06/05/17	H: 19:05; Tc: 6,0°; Ta:19° T: 1	GrLv 2			
	M4	11/05/17	H: 14:50; Tc: 1,1°; Ta:20°; T: 1				

Continuação do Anexo A. Informações referentes à amostragem na micro cervejaria.

Amostra	ID	Data de Fabricação	Condição de coleta	Lote da Matéria Prima	Formulação (%)	
5	B5 Manhã	28/04/17	H: 10:58; Tc: 67°; Ta:17°	Malte B	Valor Original	
	B5 Tarde	28/04/17	H: 16:13; Tc: 70°; Ta:21°	Malte B		
	FV5 Manhã	28/04/17	H: 13:20; Tc: 85°; Ta:21°	Lp Amargor A; Lp Aroma A		
	FV5 Tarde	28/04/17	H: 18:50; Tc: 84°; Ta:19°	Lp Amargor A; Lp Aroma A		
	FT5	11/05/17	H: 20:17; Tc: 5,9°; Ta:19°; T: 3	GrLv 3		
	M5	19/05/17	H:20:25; Tc: 1,0°; Ta:19°; T: 3			
6	B6 Manhã	11/05/17	H: 10:06; Tc: 71°; Ta:20°	Malte C	-0,46 m. +0,44 m.a.	Média maltes:
	B6 Tarde	11/05/17	H: 15:54 Tc: 65°; Ta:21°	Malte C	-2,66 m. +0,40 m.a.	-1,14
	FV6 Manhã	11/05/17	H: 12:44; Tc: 85°; Ta:21°	Lp Amargor A; Lp Aroma A		
	FV6 Tarde	11/05/17	H: 18:27; Tc: 84°; Ta:20°	Lp Amargor A; Lp Aroma A		
	FT6	19/05/17	H: 19:58; Tc: 6,0°; Ta: 19°; T:2	GrLv 2		
	M6	30/05/17	H: 12:39; Tc: 0,8°; Ta:19°; T:2			
7	B7 Manhã	12/05/17	H: 10:13; Tc: 71°; Ta:19°	Malte C	-1,25 m. +0,65 m.a.	Média maltes:
	B7 Tarde	12/05/17	H: 15:43; Tc: 71°; Ta:22°	Malte C	-2,74 m. +0,79 m.a.	-1,28
	FV7 Manhã	12/05/17	H: 12:48; Tc: 85°; Ta:21°	Lp Amargor A; Lp Aroma A		
	FV7 Tarde	12/05/17	H: 18:28; Tc: 80°; Ta:23°	Lp Amargor A; Lp Aroma A		
	FT7	19/05/17	H: 20:17; Tc: 5,9°; Ta:19°; T:10	GrLv 3		
	M7	30/05/17	H: 12:45; Tc: 2,3°; Ta:19°; T:10			
8	B8 Manhã	08/06/17	H: 10:45; Tc: 68°; Ta:22°	Malte D	-2,72 m. +0,68 m.a.	Média maltes:
	B8 Tarde	08/06/17	H: 16:22; Tc: 70°; Ta:19°	Malte D	-2,72 m. +0,68 m.a.	-2,04%
	FV8 Manhã	08/06/17	H: 13:25; Tc: 85°; Ta:19°	Lp Amargor A; Lp Aroma B		
	FV8 Tarde	08/06/17	H: 18:51; Tc: 87°; Ta:20°	Lp Amargor A; Lp Aroma B		
	FT8	16/06/17	H: 22:10; Tc: 0,04°; Ta:14°	GrLv 4		
	M8	04/07/17	H: 19:45; Tc: 0,08°; Ta:13°; T:2			
9	B9 Manhã	09/06/17	H: 13:47; Tc: 69°; Ta:16°	Malte D	-2,74 m. +0,79 m.a.	Média maltes:
	FV9 Tarde	09/06/17	H: 16:35; Tc: 86°; Ta:14°	Lp Amargor A; Lp Aroma B		
	FT9	16/06/17	H: 22:15; Tc: 0,04°; Ta:14°	GrLv 4		
	M9	04/07/17	H: 20:20; Tc: 0,09°; Ta:13°; T:4			

¹ID: identificação das amostras (B: Brassagem; FV: Fervura; FT: Fermentação; M: Maturação). ²Condições de coleta (H: Hora; Tc: Temperatura de coleta; Ta: Temperatura ambiente; T: Tanque de Armazenagem).

³Matérias Prima (Lp: Lúpulo; GrLv: Geração Levedura). ⁴Formulação: (m: malte; m.a.: malte ácido). ⁵Produção (Amostras 2, 4 e 5 foram produzidas em lote de 2000 mil litros de cerveja; amostras 1 e 3 produzidas em lote de 1800 litros; amostra 9 produzida em lote de 1000 litros).