



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

CLARA SOEIRO MAAS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CERVEJA LUPULADA
SUBMETIDA AO ENVELHECIMENTO FORÇADO**

JOÃO PESSOA
2019

CLARA SOEIRO MAAS

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CERVEJA LUPULADA
SUBMETIDA AO ENVELHECIMENTO FORÇADO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biotecnologia do Centro de Biotecnologia, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

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

JOÃO PESSOA

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

Milla Maas, Clara Soeiro.

Avaliação de parâmetros físico-químicos de cerveja
lupulada submetida ao envelhecimento forçado / Clara
Soeiro Maas. - João Pessoa, 2019.
45 f. : il.

Orientação: Kristerson Reinaldo de Luna Freire.
Monografia (Graduação) - UFPB/CBiotec.

1. Cerveja. 2. Lúpulo. 3. Envelhecimento forçado. 4.
Pasteurização. I. Freire, Kristerson Reinaldo de Luna.
II. Título.

UFPB/BC

CLARA SOEIRO MAAS

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE CERVEJA LUPULADA
SUBMETIDA AO ENVELHECIMENTO FORÇADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito para obtenção do Título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em 23 de abril de 2019.

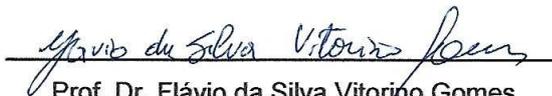
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Kristerson Reinaldo de Luna Freire

Departamento de Biologia Celular e Molecular/Cbiotec/UFPB

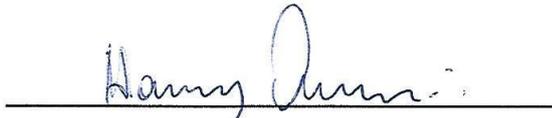
Orientador



Prof. Dr. Flávio da Silva Vitorino Gomes

Departamento de Energias Renováveis/CEAR/UFPB

Examinador



Bruno Hanry Melo de Oliveira

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia/UFPB

Examinador

*Dedico este trabalho aos meus pais, Ana Lucia e
Carlos Alberto, por todo apoio e incentivo.
Sem vocês, eu nada seria.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Kristerson, pela oportunidade de realização deste trabalho e por sua orientação, paciência e atenção durante cada etapa da elaboração do mesmo.

Aos meus colegas de laboratório, especialmente Fernando, pelo acompanhamento e disponibilidade para sanar minhas dúvidas. Ao Vinícius, por revezar comigo a rotina carregada dos experimentos. Ao Júlio e Kaíque, pela grande ajuda nas realizações dos mesmos. Ao Lucas, pela paciência e disponibilidade para acompanhar os experimentos em placa. Vocês foram fundamentais.

À Prof.^a Dr.^a Andrea, por disponibilizar o seu laboratório para realização de parte deste trabalho, e ao Hildo, pelo seu tempo doado para o acompanhamento dos experimentos e pelos direcionamentos sobre o uso dos equipamentos.

Aos amigos que fiz durante o curso, pelos anos compartilhados e por tantas boas memórias. Em especial à minha amiga Beatriz Calado, com quem dividi muito além da graduação, agradeço pelas longas e boas conversas em frente à Biblioteca Setorial ao longo desses anos, pela amizade que tanto me socorreu e pelo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Gabriel, por preencher todos os dias da minha vida com amor, compreensão e apoio inesgotáveis, em especial durante a conclusão desta etapa da minha vida, na qual sem tê-lo como meu porto seguro, o caminho teria sido muito mais árduo.

Aos meus pais, por serem os primeiros a abraçarem os meus sonhos e me darem a tranquilidade necessária para lançar-me em qualquer voo, com a certeza de um firme lugar onde posso sempre pousar.

Finalmente, a Deus, por tudo.

“Nós não podemos viver em um mundo que não é o nosso, em um mundo que os outros interpretam para nós. Um mundo interpretado não é um lar. Parte do temor é recuperar nossa própria audição, usar nossa própria voz, ver nossa própria luz.”

Frase atribuída a Santa Hildegarda de Bingen (1098-1179), autora dos primeiros registros sobre o lúpulo e seus benefícios para a cerveja.

RESUMO

O tempo de prateleira de uma cerveja é determinado em maior parte pela sua estabilidade nos parâmetros microbiológicos, de sabor, de espuma, coloidais e de cor. Considerando isso, o objetivo do presente estudo foi avaliar alterações nos parâmetros de cor, pH e capacidade antioxidante de cervejas adicionadas de lúpulo à frio (*dry hopping*) (CL) e sem lúpulo por *dry hopping* (SL), submetidas ao processo de envelhecimento forçado, no qual ambas permaneceram imersas em banho-maria, à temperatura constante de 50°C, durante o período total de 144 horas. As amostras foram coletadas a cada seis horas, durante as primeiras 48 horas, e a cada doze horas, até o final do experimento. O tempo decorrido e a temperatura foram convertidos em unidades de pasteurização (UPS). A cor (EBC) foi avaliada por espectrofotometria com absorvância a 430 nm, que constatou que o aumento das unidades de pasteurização provocou aumento da cor nas duas amostras, sendo esse escurecimento mais intenso e rápido nas amostras SL, o que sugere um efeito estabilizante da adição de lúpulo. As cervejas SL apresentaram pH menor (média de 4,45) que as cervejas CL (média de 4,61), entretanto em ambas as amostras a variação durante o processo de envelhecimento forçado foi discreta. A capacidade antioxidante foi analisada através de DPPH com absorvância a 517 nm, entretanto os resultados foram inconsistentes com os achados na literatura e não seguiram nenhum padrão, sendo necessária a repetição desta etapa experimental.

Palavras-chave: cerveja; lúpulo; envelhecimento forçado; pasteurização.

ABSTRACT

Beer shelf-life is mostly determined by its microbiological, flavor, foam, colloidal and color stability. This study aims to evaluate changes in color, pH and antioxidant capacity of dry hopped beers (CL) and non-dry hopped beers (SL) stored in a 50°C water bath during the total period of 144 hours. Samples were collected every six hours, during the initial 48 hours, and every twelve hours until the end of the experiment. The storage hours were converted into pasteurization units (UPs). The color (EBC) was evaluated by spectrophotometry with absorbance at 430 nm, which verified that the increase of the pasteurization units caused an color increase in the samples, and this increase was more intense and faster on the SL samples, which suggests a stabilizer effect of hop addition in the dry hopping stage. SL samples presented lower pH (average 4.45) than the CL samples (average of 4.61), but there were no significant changes in the pH during the aging process. The antioxidant capacity was analyzed by DPPH with absorbance at 517 nm, but the results weren't in according to the previous studies found in the literature, requiring this analysis to be repeated.

Key-words: beer; hop; forced aging; pasteurization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Flor de lúpulo.....	18
Figura 2: Lúpulo em pellets	19
Figura 3: Fluxograma simplificado da produção das cervejas, com e sem a etapa de <i>Dry Hopping</i>	24
Figura 4: Escala EBC de cores de cervejas.....	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Unidades de pasteurização (UPs) por hora em temperatura constante de 50°C.....	26
Tabela 2: Cálculo das diluições de Trolox para construção da curva analítica.....	28
Tabela 3: Atividade de absorção de radicais livres do DPPH de cervejas sem (SL) e com adição de lúpulo por <i>dry hopping</i> (CL) de acordo com as horas decorridas/unidades de pasteurização e valores expressos em porcentagem de inibição e em $\mu\text{mol TE/L}$	37

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Variação da cor de acordo com a pasteurização de cervejas sem adição lúpulo por <i>dry hopping</i> (SL).....	31
Gráfico 2: Variação da cor de acordo com a pasteurização de cervejas com adição de lúpulo por <i>dry hopping</i> (CL).....	32
Gráfico 3: Comparação da variação de cor de acordo com UPS de cervejas SL e CL.....	33
Gráfico 4: Análise do pH das cervejas SL e CL de acordo com as horas decorridas.....	35
Gráfico 5: Variação de pH ao decorrer da variação de cor de cervejas SL e CL.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL	Amostra de cerveja com adição de lúpulo a frio pela etapa de <i>dry hopping</i>
EBC	European Brewing Convention
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
Nm	Nanômetro(s)
pH	Potencial hidrogeniônico
SL	Amostra de cerveja sem adição de lúpulo a frio pela etapa de <i>dry hopping</i>
SRM	Standard Reference Method
UPs	Unidades de Pasteurização

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
2.1	HISTÓRICO DA CERVEJA	15
2.2	COMPONENTES DA CERVEJA	16
2.2.1	O Lúpulo	18
2.3	PARÂMETROS DE ESTABILIDADE DA CERVEJA	20
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	ELABORAÇÃO DA CERVEJA	24
4.2	ENVELHECIMENTO FORÇADO	25
4.3	ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	27
4.3.1	Análise de Cor	27
4.3.2	Análise de pH	27
4.3.3	Método DPPH	27
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	ANÁLISE DA COR (EBC)	30
5.2	ANÁLISE DE pH	34
5.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	39
	REFERÊNCIAS	40
	GLOSSÁRIO	45

1 INTRODUÇÃO

A legislação brasileira, de acordo com o Decreto nº 6.871 de 04 de junho de 2009, define cerveja como uma bebida obtida através da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, originado a partir do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo. Atualmente, o Brasil ocupa o posto de terceiro maior produtor mundial de cerveja, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China, com sua média anual de consumo por habitante crescendo a cada ano (SINDCERV, 2019).

Independentemente do tipo de cerveja a ser fabricado, os princípios do processo de fabricação devem ser mantidos constantes. O controle da qualidade de cada um dos ingredientes e do processo de fabricação é indispensável a fim de atender a parâmetros específicos de brilho, espuma, aroma e sabor da bebida. Da mesma maneira, durante o seu armazenamento, é esperado que cervejas distintas sejam afetadas de maneiras diferentes por variáveis como tempo e temperatura, comprometendo suas características iniciais e seu tempo de vida útil (VANDERHAEGEN, 2006).

O tempo de vida útil de um alimento é definido por Fu e Labuza (1993) como correspondente ao período necessário para que o mesmo se torne inaceitável do ponto de vista tanto sensorial e nutricional, como também do ponto de vista de segurança alimentar. Além de ser determinado em função do tempo decorrido desde a produção do alimento, também engloba fatores do ambiente em que o mesmo foi armazenado e sua suscetibilidade a mudanças em sua qualidade. (LABUZA; SZYBIST, 2008; GÍMENEZ; ARES, ARES, 2012). A avaliação do tempo de vida útil (também chamado de tempo de prateleira) de um produto pode ser realizada a partir da observação e análise de algum parâmetro de acordo com o tempo decorrido (SINGH, 1994; NIMUBONA et al., 2013).

Assim, como outros alimentos, diversos parâmetros da cerveja podem sofrer mudanças durante sua armazenagem. De acordo com Vanderhaegen (2006), o tempo de prateleira de uma cerveja é determinado em maior parte pela sua estabilidade nos parâmetros microbiológicos, de sabor, de espuma, coloidais e de cor.

À medida que o consumo de cerveja cresce, cresce também a demanda por mais estudos acerca da bebida, tanto nos seus aspectos nutricionais, considerando seus impactos na saúde humana, como também acerca de seus compostos, a fim de

garantir maior estabilidade e melhor qualidade tanto de fatores sensoriais quanto físico-químicos. Visando um melhor entendimento sobre os impactos físico-químicos em cervejas durante o envelhecimento, o intuito deste trabalho foi avaliar alterações nos parâmetros de cor, pH e capacidade antioxidante de cervejas lupuladas e não lupuladas submetidas ao processo de envelhecimento forçado.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 HISTÓRICO DA CERVEJA

Derivada da palavra em latim *bibere* (beber), estima-se que a produção da cerveja teve início por volta de 8.000 a.C. Estudos indicam sua origem na Mesopotâmia, onde a cevada crescia em estado selvagem. A bebida, desenvolvida paralelamente aos processos fermentativos de cereais como milho, centeio e cevada, foi difundida inicialmente pelos povos da Suméria, Babilônia e Egito, e posteriormente pelos povos gregos e romanos (DRAGONE; SILVA, 2010; MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011).

Na Idade Média, os procedimentos de produção foram impulsionados devido à influência dos mosteiros e sua iniciativa de produção em maior escala. Os mosteiros medievais foram responsáveis pelo aperfeiçoamento das técnicas de fabricação e introdução de diferentes tipos de ervas como o *gruit*, uma mistura de ervas que era adicionada à produção de cerveja geralmente em forma de buquê e era responsável pela aromatização e por dar um sabor especial e mais um toque inebriante à bebida. Tais experiências culminaram no século XI com a adição do lúpulo (MORADO, 2009; MALAJOVICH, 2012). Morado (2009) ressalta que, embora já se usasse o lúpulo para produção da bebida desde o século IX, seu primeiro registro foi encontrado nos escritos de 1150 da monja beneditina alemã Hildegarda de Bingen (1098-1179). Nele, foram descritas as qualidades do lúpulo como conservante e destacados seus benefícios medicinais como relaxante. As propriedades de conservação do lúpulo configuraram uma das principais razões para sua adesão, pois tanto a produção quanto o armazenamento da cerveja nos meses quentes eram difíceis devido às altas temperaturas que facilitavam a ação dos micro-organismos presentes no ar, o que contribuía para o azedamento mais rápido da bebida. Somado a isso, a descoberta da técnica de fermentação baixa, no século XIV, forneceu maior estabilidade à bebida. Já os trabalhos de Louis Pasteur e o progresso da Microbiologia no século XIX fomentaram o desenvolvimento de uma grande indústria cervejeira (MALAJOVICH, 2012).

O setor cervejeiro surgiu no Brasil a partir da chegada da família real portuguesa, em 1808, e de outros imigrantes que iniciaram sua produção em terras brasileiras (LIMBERGER, 2013). Com a abertura dos portos às nações amigas de

Portugal, a entrada de cervejas importadas foi possibilitada, e a Inglaterra foi a primeira a introduzir a cerveja na antiga colônia (MEGA; NEVES; ANDRADE, 2011). Com a popularização da bebida, iniciou-se um movimento de produção de cerveja brasileira (COUTINHO; QUINTELLA; PANZANI, 2008).

Atualmente, o Brasil ocupa o posto de terceiro maior fabricante mundial de cerveja, de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja (2016), se destacando no mercado cervejeiro mundial com a maior empresa no ramo, a AB Inbev, composta da fusão de empresas como a Brahma, a Antarctica, a Interbrew e a Anheuser-Busch. O setor cervejeiro nacional é responsável por 1,6% do PIB Nacional e faturou R\$ 107 bilhões em 2017 (CERVBRASIL, 2017).

2.2 COMPONENTES DA CERVEJA

Atualmente, o Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009, define cerveja como uma bebida obtida através da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, originado a partir do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, e com adição de lúpulo. Entretanto, mesmo concentrando-se nestes ingredientes, a cerveja é uma bebida bastante versátil, tendo em vista que a proporção destes ingredientes e variáveis no processo de fabricação influenciam a diversidade de estilos e o amplo espectro de variações da bebida (MORADO, 2009). Exemplos disso são as variáveis de cevada utilizadas, o local e a estação do ano de cultivo da mesma, o tipo de malteação, o método de preparo do macerado, o uso de adjuntos, o tipo de filtração do mosto, a água utilizada (leve ou pesada), os tipos de lúpulos usados e o momento em que são adicionados, o tipo de levedura utilizada, o tempo de fermentação e maturação, o tipo ou ausência de filtração da cerveja, a ausência ou não de pasteurização e o controle do binômio tempo-temperatura e do pH em todas as etapas (VARNAM; SUTHERLAND, 1994; RODRIGUES, 2000; GERHAUSER, 2005). Em suma, o controle da qualidade de cada um destes ingredientes é indispensável a fim de atender a parâmetros específicos de brilho, espuma, aroma e sabor da bebida, pois o conjunto dessas variáveis de fabricação determinará a qualidade final do produto.

A água compõe de 90 a 95% da cerveja (KEUKELEIRE, 2000). A elevada quantidade de água associada à concentração de sais minerais é responsável por tornar a cerveja hidratante e refrescante (HUGHES; BAXTER, 2001; JIMÉNEZ et al, 2009). Por isso, a mesma deve ser incolor, inodora, insípida e isenta de turbidez, além

de apresentar uma pequena carga microbiana e baixa concentração de gases dissolvidos (DRAGONE; SILVA, 2010). A dureza da água se relaciona com a concentração total de íons cálcio e magnésio. O cálcio protege as enzimas alfa-amilases do calor da mostura. Isso contribui para uma maior hidrólise do amido durante a mosturação. Além disso, sua presença estimula a ação enzimática de proteases e amilases, aumentando o teor de açúcares fermentáveis e compostos nitrogenados no mosto. O magnésio, proveniente principalmente do malte, atua como cofator enzimático durante a etapa de fermentação (BERNSTEIN; WILLOX, 1977).

Embora outros cereais também possam ser utilizados para a produção de cerveja, a cevada é a preferencial devido a suas características de teor de amido, riqueza proteica, uniformidade dos grãos e quantidades de cascas (AQUARONE; LIMA; BORZANI, 2001). A cevada (*Hordeum sp.*) é uma gramínea cultivada em regiões de clima temperado (HORNSEY, 1999), cultivada em vários estados brasileiros durante o inverno. O malte de cevada é obtido a partir do processo de malteação, um processo de germinação em condições controladas (TEIXEIRA; CRUZ, 2014). O intuito do processo de malteação é desenvolver o poder diastático do cereal e ativar enzimas como alfa-amilase e beta-amilase, amiloglicosidase, beta-glucanase, protease, beta-glucanosolubilase e pentosanase, que serão responsáveis pela conversão do amido em açúcares fermentáveis (LIMA et al, 2001; O'ROURKE, 2002; NOGUEIRA, 2006). Fatores como a variedade da cevada, a temperatura, a aeração, o grau de torrefação, a umidade e a secagem influenciam no processo de malteação (TEIXEIRA; CRUZ, 2014). Outros cereais podem ser adicionados como adjuntos cervejeiros, substituindo o malte de cevada por outras fontes de carboidrato, sendo normalmente utilizado amiláceos, açúcares e extratos (HUMBERSTONE; BRIGGS, 2000; MORADO, 2009).

As leveduras cervejeiras, tradicionalmente usadas na produção de cervejas, são linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (tipo ale) ou *S. pastorianus* (tipo lager) (OLIVEIRA, 2011). As leveduras, ao fermentarem o açúcar do mosto, produzem álcool e outros subprodutos, alterando assim as propriedades organolépticas da bebida (BOTELHO, 2009). Distinguem-se fundamentalmente em dois tipos: Ale, utilizadas em temperaturas de 15 a 22° C, e Lager, utilizadas em temperaturas entre 7 a 15° C (BOTELHO, 2009).

2.2.1 O Lúpulo

O lúpulo é considerado um ingrediente indispensável para a produção de cerveja (DRAGONE; SILVA, 2010). Da espécie *Humulus lupulus L.* (Figura 1), é uma planta da família Cannabaceae cultivada quase exclusivamente para a fabricação de cerveja. Cerca de 97% da plantação mundial é utilizada com este propósito (ALMAGUER, 2014). Caracteriza-se por ser uma planta originária de climas temperados, trepadeira, perene e dióica, o que significa que tem as flores femininas e masculinas em indivíduos diferentes. Desta planta, são utilizadas as inflorescências femininas, formadoras dos cones ou estróbilos da planta onde se desenvolvem glândulas secretoras de lupulina, capazes de sintetizar e armazenar resinas e óleos essenciais ricos em terpenos fenólicos e polifenóis (CLARK et al., 2013; KUNZE, 1999; DRAGONE; SILVA, 2010). Estes elementos são responsáveis por conferir aroma, sabor e amargor, e têm sido utilizados ao longo da história com a função de preservar a cerveja.

Figura 1: Flor de lúpulo.



Fonte: Evangelista, 2012.

As variedades de lúpulo são classificadas de acordo com a quantidade de resinas e óleos essenciais. As variedades dos lúpulos são divididas, basicamente, em: lúpulos para aroma, para amargor e que conferem ambas as características (PALMER, 2006). Sendo assim, cada tipo de lúpulo possui a sua combinação diante dos parâmetros de aroma e sabor, permitindo que o cervejeiro determine o que mais convém para cada receita, determinando também o melhor momento de acrescentá-

lo ao processo: se no início, durante ou ao final da fervura, ou, até mesmo, ao final da fermentação, esta última técnica chamada de *dry hopping* (MORADO, 2009).

Para processo de fabricação da cerveja, os lúpulos são disponibilizados em três formas: como cones frescos, pouco usados devido à sua sensibilidade à umidade, que compromete seu prazo de validade ao período de uma semana; cones desidratados, que mantêm preservados seus principais óleos e resinas; e pellets de lúpulo (Figura 2), o formato mais comum, no qual folhas e cones recém-colhidos são prensados e embalados a vácuo para conservação.

Figura 2: Lúpulo em pellets.



Fonte: Maas, 2019.

O estudo das propriedades de alguns compostos presentes no lúpulo revelou efeitos bioativos em grande parte de seus metabólitos. Os compostos fenólicos presentes na cerveja advindos do lúpulo, além de desempenharem um papel importante nas características sensoriais e nutricionais, possuem propriedades em relação à quimioprevenção do câncer, efeitos cardioprotetores, propriedades anti-inflamatórias, estimulantes do sistema imunológico, antialérgicos, antivirais e bactericidas devido à presença de iso-alfaácidos (KONDO, 2003; BOTELHO, 2009). Quando consumida com moderação, a cerveja pode ser um alimento auxiliar como fonte de compostos fenólicos, possuindo boa capacidade antioxidante (RYBKA, 2010). González-Gross et al. (2000) caracterizaram como componentes do lúpulo

resinas, óleos essenciais e polifenóis. As inflorescências secas de lúpulo contêm de 4 a 14 % de polifenóis, principalmente ácidos fenólicos, chalconas preniladas, catequinas, proantocianidinas e flavonoides. Estes últimos são responsáveis por uma série de propriedades bioativas, sedativas, estrogênicas e anticancerígenas. Devido à presença de xanthohumol e isoxanthohumol, o lúpulo é responsável por grande parte das propriedades antioxidantes conhecidas na cerveja (STEVENS et al., 1999; CEH et al., 2007), com atividade antioxidante comparável ao resveratrol do vinho (VINSON et al., 2003; PINTO et al., 2012). O total de antioxidantes depende do tipo de cerveja, das matérias-primas utilizadas e do processo de fabricação, mas estima-se que cerca de 70 a 80 % dos polifenóis da cerveja sejam oriundos do malte, enquanto de 20 a 30% são oriundos do lúpulo (HUMBERSTONE; BRIGGS, 2000).

2.3 PARÂMETROS DE ESTABILIDADE DA CERVEJA

Fu e Labuza (1993) definem o tempo de vida útil de um alimento como correspondente ao período necessário para que o mesmo se torne inaceitável do ponto de vista tanto sensorial e nutricional como também do ponto de vista de segurança alimentar. Além de ser determinado em função do tempo decorrido desde a produção do alimento, também engloba fatores do ambiente em que o mesmo foi armazenado e sua suscetibilidade a mudanças em sua qualidade (LABUZA; SZYBIST, 2008; GÍMENEZ, ARES, ARES, 2012). A avaliação do tempo de vida útil (também chamado de tempo de prateleira) de um produto pode ser realizada a partir da observação e análise de algum(ns) parâmetro(s) de acordo com o tempo decorrido (SINGH, 1994; NIMUBONA et al., 2013).

Assim como para outros alimentos, diversos parâmetros da cerveja podem ser submetidos a mudanças durante armazenagem. De acordo com Vanderhaegen (2006), o tempo de prateleira de uma cerveja é determinado em maior parte pela sua estabilidade nos parâmetros microbiológicos, de sabor, de espuma, coloidais e de cor.

Segundo Smythe, O'Mahony e Bamforth (2002), a percepção da cor da cerveja pelo consumidor influencia na sua opinião sobre amargor, sabor, probabilidade de compra, entre outros. Além disso, mudanças na cor das cervejas, como perda de brilho e declínio de transparência, são manifestações visuais de instabilidade da cerveja (MARTÍNEZ et al., 2017). A cor da cerveja advém principalmente do malte da cevada e de adjuntos como arroz, aveia e milho (SPEAROT, 2016), e se desenvolve

de maneira mais intensa durante as etapas de mosturação e de fermentação, devido aos compostos extraídos dos grãos de malte e a formação de outros (MALLETT, 2014; SPEAROT, 2016). Dentre esses compostos, se encontram os polifenóis, que também podem ser provenientes do lúpulo. Tais compostos são associados à instabilidade de cervejas no que se refere ao sabor durante o período de armazenamento da bebida (ARON; SHELLHAMMER, 2010) e à instabilidade da cor, da espuma e de sua estabilidade coloidal (DVORAKOVA et al., 2008; ARON; SHELLHAMMER, 2010).

As fases de germinação e secagem do processo de maltagem são determinantes para a formação de cor devido à presença das reações de escurecimento de Maillard e as reações de caramelização e pirólise. Além disso, a oxidação de polifenóis derivados da casca de cevada e do lúpulo podem contribuir para o escurecimento da cor durante o armazenamento e o envelhecimento da cerveja. Estudos indicam que os produtos da reação de Maillard também podem influenciar na estabilidade oxidativa e tempo de prateleira de diversos alimentos (OÑATE-JAÉN; BELLIDO-MILLA; HERNÁNDEZ-ARTIGA, 2006). A levedura, embora não afete diretamente a cor da cerveja, pode comprometer a mesma ao promover a turbidez quando presente na fase de envase, como ocorre com o estilo *Weizenbier* (BAMFORTH; RUSSEL; STEWART, 2011).

As reações de escurecimento de Maillard desempenham um papel fundamental na cor da cerveja. Ocorrem no endosperma da cevada durante a malteação, mas podem ocorrer também durante a fervura do mosto. Os dois principais componentes desta reação são açúcares redutores (principalmente maltose) e aminoácidos livres. Embora as etapas iniciais da reação de Maillard sejam razoavelmente bem definidas, as reações que conduzem à formação de melanoidinas coloridas não foram elucidadas (BAMFORTH, RUSSEL; STEWART, 2011). Rearranjos estruturais de monômeros de flavan-3-ol também foram apontados como responsáveis por alterações na cor de cervejas durante o armazenamento (CALLEMIEN; COLLIN, 2007).

A cerveja pode ser classificada quanto à cor seguindo duas escalas: a Standard Reference Method (SRM) e a European Brewery Convention (EBC), esta última sendo a empregada pela legislação brasileira, de acordo com o Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009, que aborda a quantificação da cor em cervejas no país. Assim sendo, uma cerveja deve ser enquadrada em uma das seguintes três categorias: cerveja clara, se tiver cor correspondente a menos de 20 unidades EBC; cerveja escura, com

cor correspondente a 20 ou mais unidades EBC; e cerveja colorida, que pela ação de corantes naturais, apresente coloração diferente das definidas no padrão EBC.

A pasteurização é adotada a fim de assegurar a estabilidade da cerveja do ponto de vista microbiológico. Hoff et al (2013) ressaltam que, apesar da ampla aplicação da técnica, a influência da pasteurização na estabilidade da cerveja do ponto de vista físico-químico não é bem descrita, com resultados contraditórios nos poucos estudos realizados. Cao et al. (2011) constataram que níveis crescentes de pasteurização influenciam negativamente a estabilidade da cerveja, com o aumento do grau de pasteurização resultando em seu escurecimento, diminuição de polifenóis e amargor durante o armazenamento, assim como a diminuição da concentração de compostos ésteres voláteis associados ao frescor da cerveja. Concluem que a diminuição da intensidade de pasteurização pode beneficiar a estabilidade da cerveja ao desacelerar o envelhecimento da mesma.

Kaneda et al. (1994) estudaram a geração de radicais em cervejas pasteurizadas e não pasteurizadas usando Espectroscopia de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR) e quimiluminescência, onde a pasteurização resultou em um aumento de reações radicais. Estudos também mostraram que a pasteurização da cerveja filtrada melhorou a estabilidade oxidativa durante o armazenamento em comparação com a cerveja não pasteurizada (LUND et al., 2012).

O processo de envelhecimento forçado é usado na indústria cervejeira como um teste para prever a estabilidade da cerveja a longo prazo (SANTOS et al., 2003), embora ainda seja um processo complexo e de difícil controle (VANDERHAEGEN et al., 2006). Com o crescimento da exportação de cervejas devido à globalização, questões relacionadas à estabilidade e tempo de prateleira de cervejas podem se configurar como problemas complexos para cervejarias, em especial no que tange a pequenas cervejarias. Devido a isto, é importante a investigação dos efeitos da pasteurização vinculados ao envelhecimento a fim de elucidar o comportamento de variáveis físico-químicas da cerveja em tais condições.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar parâmetros físico-químicos de cervejas adicionadas e não adicionadas de lúpulo a frio pela etapa de *dry hopping* submetidas ao processo de envelhecimento forçado.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produção de dois tipos de cervejas, sem adição de lúpulo a frio e com adição de lúpulo a frio através do processo de *dry hopping*.
- Envelhecer, a 50° C em banho-maria, as cervejas com e sem adição de lúpulo a frio.
- Analisar os efeitos do envelhecimento forçado no pH de ambas as cervejas.
- Avaliar cor (EBC) de ambas as cervejas de acordo com o grau de pasteurização obtido pelo processo de envelhecimento forçado.
- Investigar o potencial antioxidante de cervejas lupuladas e não lupuladas submetidas ao envelhecimento forçado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ELABORAÇÃO DA CERVEJA

Para a produção da cerveja foi realizado o desenho da receita no *software* “BeerSmith™ 2” (SMITH, 2019), utilizando como estilo base uma *American IPA*. Para a produção do mosto foi utilizada a panela automatizada Grainfather®, com capacidade de operação de 10L a 25L e que apresenta sistema de programação remota das etapas da brassagem. O processo de elaboração da cerveja artesanal está resumido e demonstrado na Figura 3.

Figura 3: Fluxograma simplificado da produção das cervejas, com e sem a etapa de *Dry Hopping*



Fonte: Maas, 2019.

A moagem dos maltes foi realizada em moinho de dois rolos (Monstermill®), com abertura de 1,3 mm, possibilitando a moagem do malte com baixa fragmentação da casca. A mosturação durou 120 minutos, divididos em três paradas: a primeira a 50°C, por 10 min; elevação para 68°C; manutenção a 68°C por 60 minutos; elevação para 78°C; manutenção a 78 °C por 10 minutos, para inativação enzimática. Após isto, houve a separação do líquido do bagaço e lavagem dos grãos.

A fervura teve duração de 60 minutos e o lúpulo de amargor foi adicionado no início da fervura. Após a fervura, realizou-se a etapa de *whirlpool*, que consiste em movimentar o mosto em espiral, para diminuir a transferência dos sedimentos, constituídos principalmente de proteínas de alto peso molecular, e lúpulo para o fermentador (KUNZE, 1999). No final desta etapa, foi adicionada uma porção de lúpulos de aroma e sabor. Resfriou-se o mosto com auxílio de um *chiller* de imersão, com circulação de água gelada, até atingir temperatura em torno de 20°C. Transferiu-se o mosto para o tanque de fermentação, no qual houve a inoculação do fermento propagado do tipo *A/e* (US-05), da marca Fermentis®. A fermentação foi conduzida a uma temperatura de 19°C até a atenuação de açúcares do mosto, sendo monitorado com densímetro. Esta etapa teve duração de 7 dias.

Após a fermentação, foi realizada uma etapa de maturação a 14°C, por 7 dias, com o objetivo de floculação da matéria em suspensão. Ao fim deste processo, foi transferida metade da cerveja para um barril, que foi mantido a 0°C, para carbonatação forçada. Na outra metade, que permaneceu no fermentador, foram adicionados 7 g/L de lúpulo, em uma etapa chamada de adição de lúpulo à frio (*Dry Hopping*), e a cerveja foi mantida a 14°C, por 3 dias. Após, a temperatura foi reduzida para 0°C e mantida por mais dois dias. Em seguida, a cerveja foi transferida para outro barril de inox, mantido a 0°C, para carbonatação forçada, por um período de cinco dias (MOSHER, 2015).

Após este período, as duas cervejas com adição de lúpulo a frio pela etapa *dry hopping* (CL) e sem adição de lúpulo a frio (SL) foram envasadas, por contrapressão, em garrafas de coloração âmbar de 300 ml, previamente lavadas e desinfetadas com solução a 0,1% de desinfetante em pó a base de ácido peracético. Foi utilizado arrolhador manual para fechar as garrafas, as quais foram armazenadas a 18°C, por um período de 48 horas, e depois foram acondicionadas sob refrigeração em geladeira ($4^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$), até o início da etapa de envelhecimento forçado.

4.2 ENVELHECIMENTO FORÇADO

Trinta e duas amostras de cervejas, sendo dezesseis com adição de lúpulo a frio na etapa de *dry hopping* (CL) e dezesseis sem adição de lúpulo a frio (SL), foram submetidas a envelhecimento forçado. As mesmas permaneceram pelo período de seis dias em banho-maria, imersas em água até o gargalo, sob a temperatura

constante de 50°C, enquanto as amostras controle (uma SL e uma CL) permaneceram acondicionadas sob refrigeração em geladeira. Um par de amostras, com uma de cada tipo, foi retirado do banho-maria a cada seis horas pelas primeiras 48 horas. A partir daí foram retirados a cada doze horas, até completarem seis dias (144 horas). Após retiradas, as amostras retornaram para o acondicionamento sob refrigeração em geladeira até a realização das análises físico-químicas.

As amostras foram classificadas de acordo com seu grau de pasteurização, em Unidades de Pasteurização (UPs), de acordo com a seguinte fórmula:

$$UP = t_p \times 1.389^{T_p - 60}$$

Onde t_p é o tempo de pasteurização em minutos e T_p é a temperatura durante o processo. Nesta temperatura, a cada seis horas foram somados 13,5 UPs, como mostra a Tabela 1 abaixo, preenchida de acordo com as horas de retirada das amostras do banho-maria:

Tabela 1: Unidades de pasteurização (UPs) por hora em temperatura constante de 50°C.

Horas	Minutos	UPs
1	60	2,2
6	360	13,5
12	720	26,9
18	1080	40,4
24	1440	53,9
30	1800	67,3
36	2160	80,8
42	2520	94,3
48	2880	107,7
60	3600	134,7
72	4320	161,6
84	5040	188,5
96	5760	215,5
108	6480	242,4
120	7200	269,3
132	7920	296,3
144	8640	323,2

Fonte: Maas, 2019.

4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

4.3.1 Análise de Cor

A cor da cerveja foi medida a partir do método espectrofotométrico Analytica – EBC (EUROPEAN BREWERY CONVENTION, 2000), obedecendo à seguinte equação:

$$Cor (EBC) = A * f * 25$$

Onde A = absorvância a 430 nm e f = fator de diluição.

As análises foram feitas em triplicatas de todas as amostras de cervejas produzidas e o branco feito com água destilada.

4.3.2 Análise de pH

O pH foi medido eletronicamente através de um potenciômetro de eletrodos previamente calibrado com soluções-tampão de pH 4 e 7. O eletrodo foi imerso nas amostras de cervejas juntamente com um termostato para correção de temperatura (IAL, 2008).

4.3.3 Método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Foi preparado 200ml de solução 100 µM de DPPH e, para construção da curva padrão, foi preparado 50ml de solução 1500 µM de Trolox, sendo metanol o solvente. Esta solução de Trolox foi diluída em 8 ependoffs de 1,5 ml para concentrações que variaram de 50-1500 µM. Os dados para as diluições da solução de Trolox foram calculados através da relação abaixo:

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

As concentrações calculadas seguem na Tabela 2, a seguir, onde os dados na coluna em negrito significam os volumes que foram coletados da solução estoque de Trolox para fazer as diluições nos ependoffs.

Tabela 2: Cálculo das diluições de Trolox para construção da curva analítica.

V2 Volume dos ependoffs (ml)	C2 Concentração final (M)	C1 Concentração inicial (µM)	V1 Volume a ser coletado (L)	Conversão para mL
0,0015	0,00005	0,0015	0,00005	0,05
0,0015	0,00025	0,0015	0,00025	0,25
0,0015	0,00045	0,0015	0,00045	0,45
0,0015	0,00065	0,0015	0,00065	0,65
0,0015	0,00085	0,0015	0,00085	0,85
0,0015	0,00105	0,0015	0,00105	1,05
0,0015	0,00125	0,0015	0,00125	1,25
0,0015	0,0015	0,0015	0,0015	1,5

Fonte: Maas, 2019.

O branco do experimento foi feito com DPPH e metanol.

Para leitura das absorbâncias para construção da curva padrão foram transferidos 310µl das soluções contidas nos ependoffs para uma placa de 96 poços e em seguida foi verificado o valor da absorbância no comprimento de onda de 517 nm. Para análise das amostras, foram coletados 10µl das mesmas e 300 µl da solução de DPPH.

Para plotagem da curva em gráfico de dispersão, foi utilizado o Microsoft Excel®, organizando os dados em duas colunas, uma por vez. Após ter os pontos do gráfico, foi traçada uma linha de tendência linear e pedido para exibir a equação da reta e o valor de R², expostos a seguir:

$$y = -0,2091x + 1,038$$

$$R^2 = 0,9431$$

A capacidade antioxidante do DPPH foi calculada também de acordo com sua porcentagem de inibição, usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{\text{Absorbância do branco} - \text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do branco}} \times 100$$

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos com as análises físico-químicas foram analisados com o *software* Microsoft Excel®, a fim de gerar os gráficos correlacionando as variáveis observadas, além das médias e desvio padrão das triplicatas realizadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE DA COR (EBC)

As trinta e duas amostras, sendo dezesseis não adicionadas de lúpulo a frio por *dry hopping* (SL) e dezesseis com adição de lúpulo a frio (CL), foram submetidas ao processo de envelhecimento forçado por 144 horas, onde atingiram grau de pasteurização (medido em unidades de pasteurização, ou seja, UPs) máximo de 323. Nas primeiras 48 horas desse período, as amostras foram avaliadas de seis em seis horas, sendo a partir disso analisadas a cada intervalo de doze horas.

A variação de cor foi medida em triplicata em espectrofotômetro de cubeta a 430 nm e avaliadas com base na escala EBC, a mesma usada pela legislação brasileira (Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009), e representada na Figura 4 a seguir. De acordo com a mesma, uma cerveja é considerada clara se possuir coloração até 20 EBC, sendo valores acima disso já representativos de cervejas escuras.

Figura 4: Escala EBC de cores de cervejas.

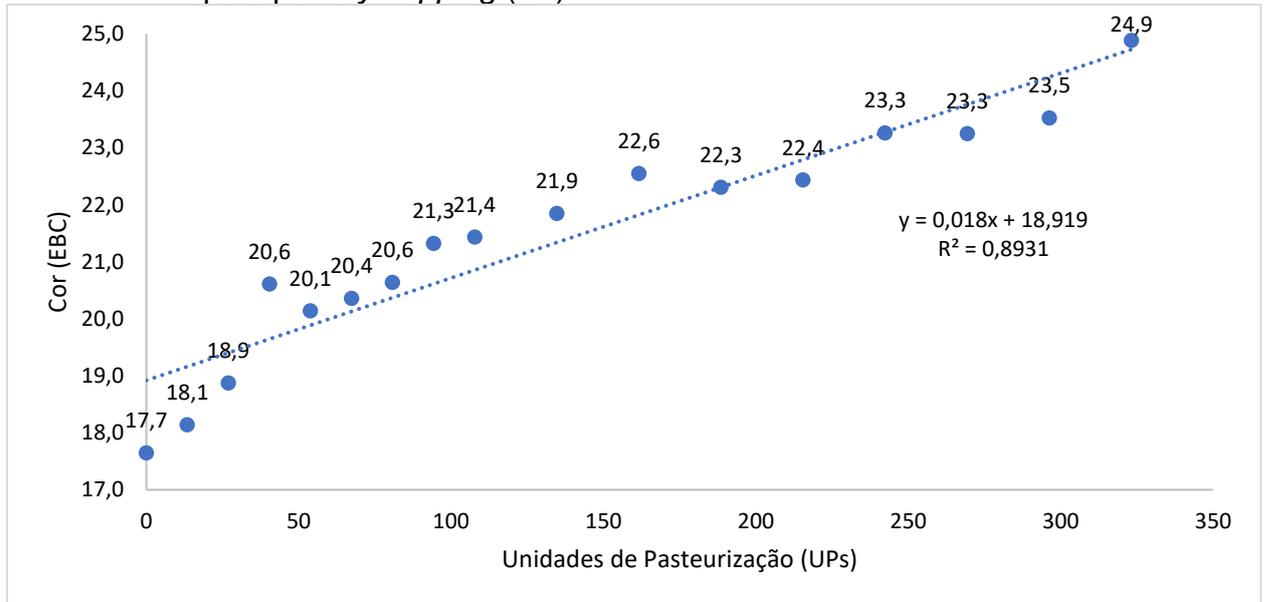
MACRO DIVISÃO	SRM	TONALIDADE	EBC	CLASSIF.**
Palha	2 - 3		3,94 - 5,91	Cerveja Clara até 20 EBC
Amarelo	3 - 4		5,91 - 7,88	
Ouro	4 - 5		7,88 - 9,85	
Âmbar	6 - 9		11,82 - 17,73	
Profundo âmbar / cobre luz	10 - 14		19,70 - 27,58	Cerveja Escuro ≥ 20 EBC
Cobre	14 - 17		27,58 - 33,49	
Profundo cobre/castanho claro	17 - 18		33,49 - 35,46	
Castanho	19 - 22		37,43 - 43,34	
Castanho Escuro	22 - 30		43,34 - 59,10	
Castanho muito escuro	30 - 35		59,10 - 68,95	
Preto	35 +		68,95 - 78,80	
Preto opaco	40+		>78,80	

Fonte: Adaptado de BJCP Guideline 2008 **Classificação de acordo com a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994

Fonte: Souza, 2016.

As cervejas SL que não foram submetidas ao processo de envelhecimento forçado apresentaram cor inicial de 17,7 EBC. Ao final do processo, a cor avaliada foi de 24,9 EBC, como exposto pelo Gráfico 1 abaixo.

Gráfico 1: Variação da cor de acordo com a pasteurização de cervejas sem adição lúpulo por *dry hopping* (SL).

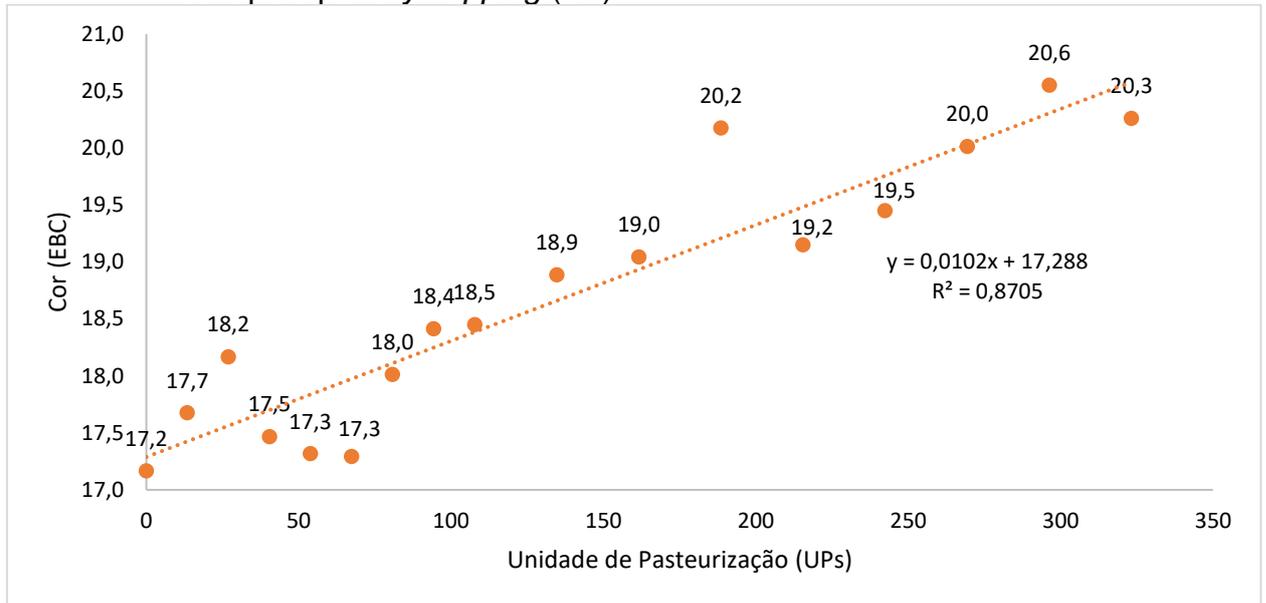


Fonte: Maas, 2019.

O Gráfico 1 evidencia o escurecimento da cerveja SL em função do aumento do tempo de aquecimento. Como mencionado anteriormente, a cerveja, que inicialmente obtinha coloração de 17,7 EBC, escureceu 7,2 EBC durante o processo, chegando a 24,9 EBC. Esse escurecimento é consoante com o aumento das unidades de pasteurização. Com isso, de acordo com a Figura 4, observa-se que a cerveja SL inicialmente era caracterizada como uma cerveja clara, na macrodivisão âmbar, e a partir de 40 UPs passou a ser caracterizada como uma cerveja escura, com cor na escala EBC maior e/ou igual a 20, se assemelhando à coloração âmbar profundo, que na escala compreende as cores 19,7 a 27,58 EBC.

O mesmo pode ser observado nas cervejas CL, como mostra o Gráfico 2.

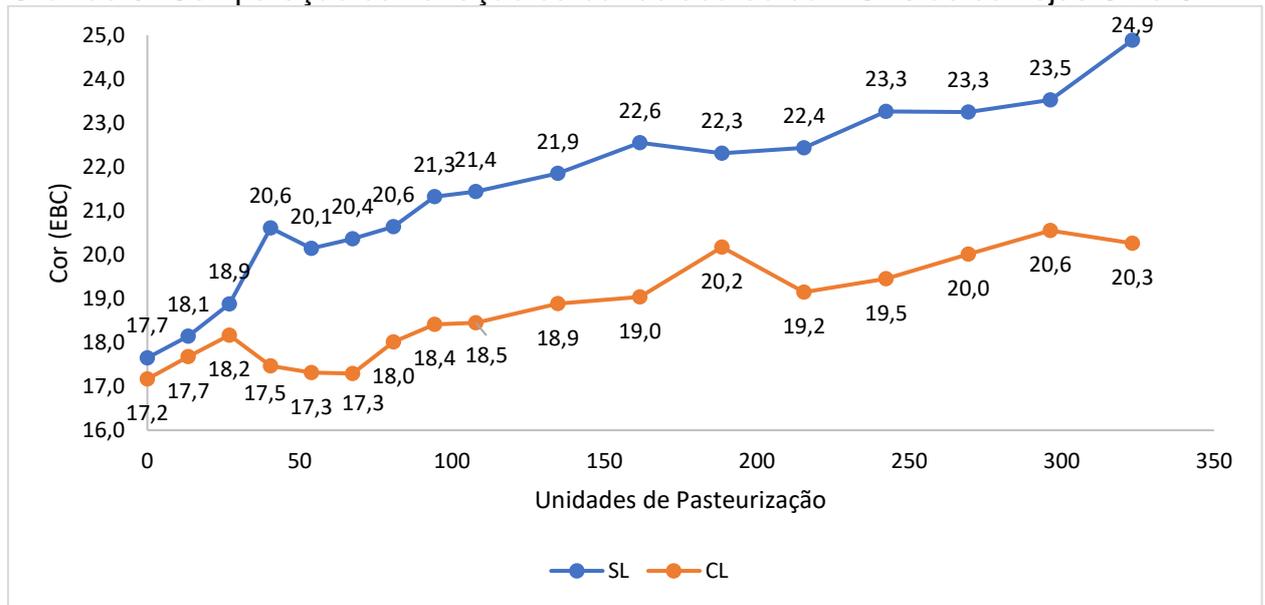
Gráfico 2: Variação da cor de acordo com a pasteurização de cervejas com adição de lúpulo por *dry hopping* (CL).



Fonte: Maas, 2019.

As amostras controle do grupo CL obtiveram cor de 17,2 EBC, enquanto as submetidas ao processo de envelhecimento forçado atingiram 20,6 EBC ao final do experimento. Além disso, enquanto as mesmas eram caracterizadas inicialmente como cervejas claras e de cor âmbar, a partir de 189 UPs, elas atingiram a cor 20 EBC, sendo consideradas cervejas escuras de tonalidade profundo âmbar.

Entretanto, quando comparadas, é notável que as cervejas SL e CL escureceram em diferentes velocidades e proporções, como mostrado no Gráfico 3 a seguir.

Gráfico 3: Comparação da variação da cor de acordo com UPs de cervejas SL e CL.

Fonte: Maas, 2019.

Enquanto a cor da cerveja SL variou de 17,7 a 24,9 EBC, a cerveja CL escureceu de 17,2 a 20,6 apenas, variando 4,3 a menos quando em comparação com a SL e com apenas quatro amostras (com 188,5, 269,3 296,3 e 323,2 unidades de pasteurização alcançadas, respectivamente) ultrapassando 20 EBC e atingindo a coloração escura de acordo com a Figura 4. A cerveja SL teve escurecimento de 40,6%, enquanto a cerveja CL escureceu apenas 19,8%. Com isso, observa-se que a cerveja SL apresentou um escurecimento mais rápido e mais intenso que a cerveja CL, sugerindo um efeito estabilizante, pelo menos no que tange à coloração das cervejas, da adição de lúpulo à frio.

A cerveja escurece durante seu armazenamento, principalmente em temperaturas elevadas (COLLIN, 2013). Vanderhaegen et al. (2006) indicam que o aumento da cor da bebida durante a armazenagem ocorre devido a moléculas derivadas principalmente da reação de Maillard e da oxidação de polifenóis. Seus resultados indicaram que reações de Maillard são mais propensas de ocorrerem durante envelhecimento de cervejas escuras e de alto teor alcóolico. Cao et al. (2013) constataram que o aumento dos níveis de pasteurização teve impacto negativo na estabilidade da cerveja, aumentando a cor das amostras estudadas, de acordo com os resultados obtidos.

Os resultados de Mikyška (2002) evidenciaram que é possível a produção de cervejas com maior tempo de prateleira e maior estabilidade de sabor a partir do uso

de materiais ricos em polifenóis, compostos presentes no lúpulo, amparando os resultados acima.

A cerveja pode continuar sofrendo alterações após o processo de envase, sendo essas mudanças, que ocorrem após certo tempo, dependentes da temperatura de armazenamento. Quanto mais alta esta temperatura, mais rápido o processo de envelhecimento (ENGAN,1969). A temperatura influencia o processo de envelhecimento forçado de cervejas ao afetar as diversas reações químicas envolvidas. O aumento da velocidade de uma reação de acordo com o aumento da temperatura depende da energia de ativação da reação, que difere de acordo com o tipo da mesma. Isso significa que diferentes taxas de reações não necessariamente aumentam de acordo com o aumento da temperatura. (VANDERHAEGEN, 2006).

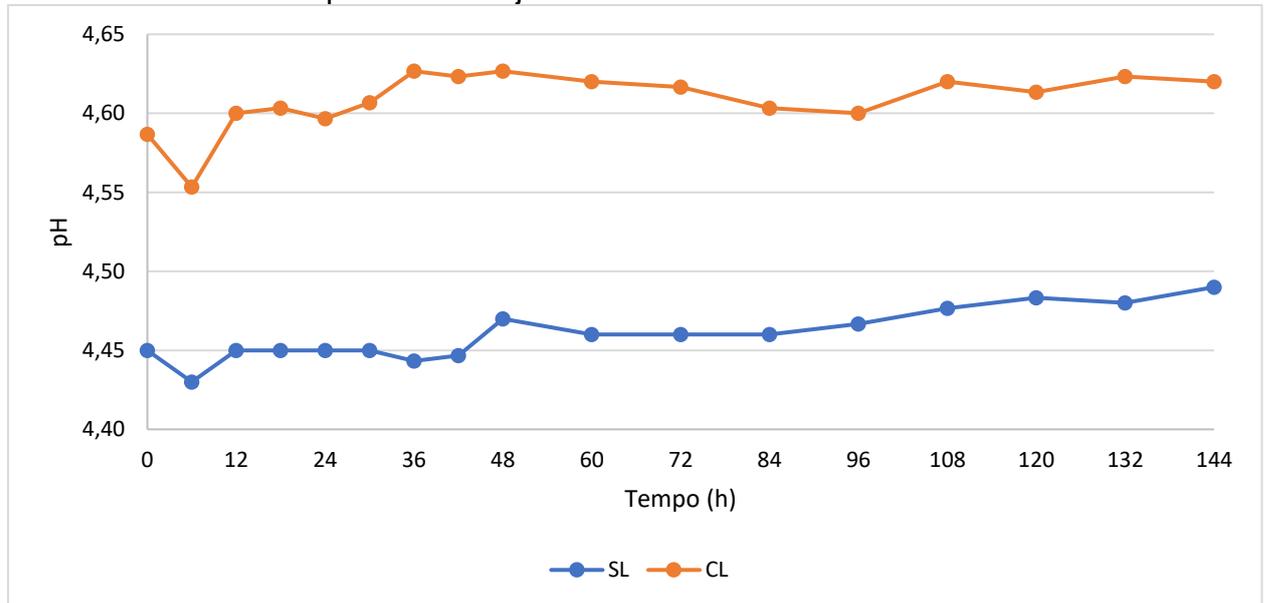
Nos estudos de Santos et al. (2003), a cerveja foi mantida a 37°C durante 7 dias, condições que o autor afirma que sejam equivalentes a um período de envelhecimento de 6 meses a 20°C.

A fim de estudar as reações de Maillard durante o armazenamento de cervejas, Vanderhaegen et al. (2004) submeteram uma cerveja de fermentação de topo recém pasteurizada a armazenamento a 60 ° C. Após 0, 3, 7, 14 e 21 dias, as amostras foram analisadas, sendo constatados níveis de escurecimento distintos em diferentes amostras, variando de 6 a 25 EBC. Outro estudo do mesmo autor, de 2007, com cervejas armazenadas por um ano a 20°C, no escuro, também indicou escurecimento das amostras. Já Li et al. (2015), ao estudarem a cinética do envelhecimento da cerveja, constatou que amostras de cervejas envelhecidas a 50°C em banho-maria envelheceram 30 vezes mais rápido que amostras em temperatura ambiente.

Deste modo, os resultados obtidos neste trabalho evidenciaram que temperaturas elevadas favorecem o escurecimento da cerveja durante seu armazenamento e que o processo de envelhecimento forçado a 50°C se mostrou interessante, pois foi possível observar um escurecimento progressivo de acordo com o tempo.

5.2 ANÁLISE DE pH

As variações de pH foram analisadas tanto isoladamente quanto em comparação com as variações de cor. Nas análises isoladas, a cerveja SL se mostrou sutilmente mais ácida do que a CL, como observado no Gráfico 4:

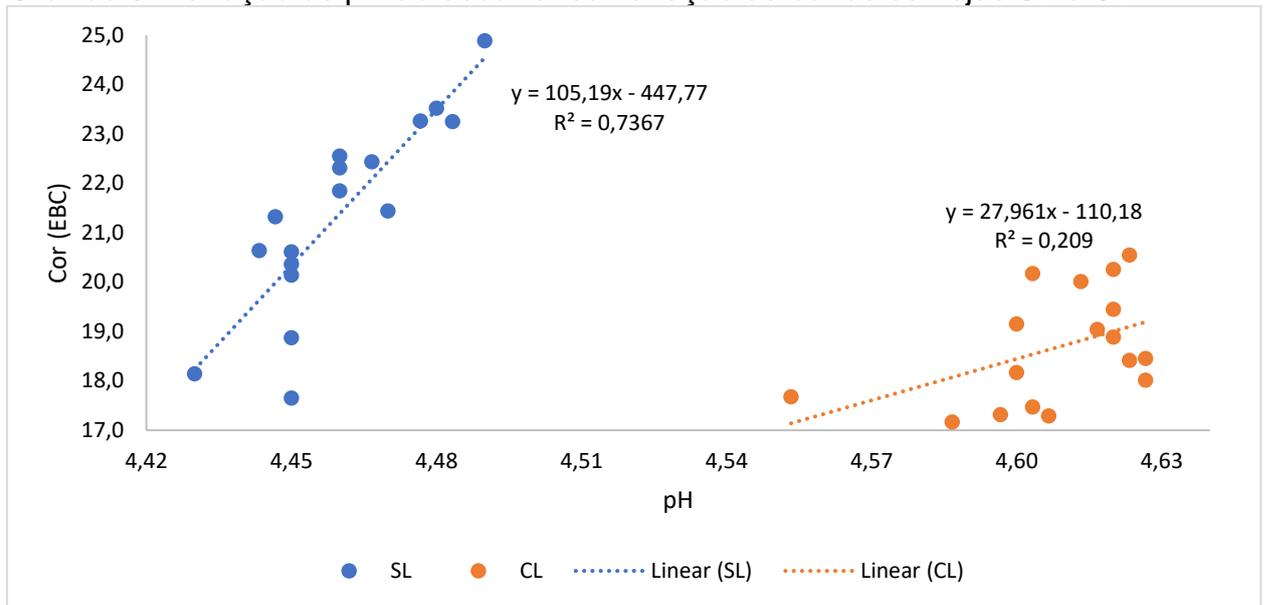
Gráfico 4: Análise do pH das cervejas SL e CL de acordo com as horas decorridas.

Fonte: Maas, 2019.

O pH da cerveja SL variou durante o período de envelhecimento forçado de 4,43 a 4,49, com média de pH de 4,45, enquanto a cerveja CL variou entre 4,55 e 4,62, com média de pH de 4,61. Como exposto, os resultados das medições de pH se mostraram pouco variantes com o decorrer do envelhecimento.

O pH mais alto das cervejas CL, que foram adicionadas de 7g/L de lúpulo na etapa de *dry hopping*, é condizente com estudos de Lafontaine e Shellhammer (2018), que ao avaliarem o impacto da etapa de *dry hopping* nas cervejas, constaram que houve um aumento de 4,11 para 4,33 com a adição de 8g/L de lúpulo nesta etapa. Já Oladokun et al. (2017), ao utilizarem 4g/L, também constaram aumento do pH de 3,8 para aproximadamente 4 no primeiro dia após a adição do lúpulo.

As análises de pH se mostraram mais significativas quando correlacionadas com as variações de cor das respectivas cervejas, evidenciado no Gráfico 5 a seguir.

Gráfico 5: Variação de pH ao decorrer da variação de cor de cervejas SL e CL.

Fonte: Maas, 2019.

A correlação cor e pH se mostrou mais significativa no caso das cervejas SL, onde o R^2 da reta resultou em 0,7, quando comparado com o R^2 das cervejas CL que resultou em 0,2, evidenciando, no caso das cervejas SL, que o aumento do pH foi melhor correlacionado com o escurecimento da cerveja.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Como exposto, as cervejas adicionadas de lúpulo tiveram uma menor variação na sua cor durante o processo de envelhecimento forçado, o que sugere uma ação estabilizante do lúpulo, possivelmente por atividade antioxidante, sendo assim o intuito desta etapa experimental verificar tal hipótese.

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) é um composto de moléculas de radicais livres estáveis que adquire coloração roxa em solventes orgânicos. O método foi aplicado para avaliar a depuração de radicais livres e a capacidade antioxidante, com a suposição de que uma maior interação com o DPPH geraria amostras mais claras, tendo em vista que o DPPH estaria sendo consumido pelos antioxidantes presentes na cerveja, gerando porcentagens de absorção pelo espectrofotômetro maiores que zero.

Na Tabela 3 estão apresentados os valores obtidos para atividade antioxidante de cervejas SL e CL. Os valores estão expressos em porcentagem de inibição e em

μmol de Trolox Equivalente (TE) por L de amostra, de acordo com as horas em banho maria a 50°C e de acordo com as unidades de pasteurização obtidas através do processo de envelhecimento forçado. Os valores foram obtidos após análise em espectrofotômetro de placa a 517 nm.

Tabela 3: Atividade de absorção de radicais livres do DPPH de cervejas sem (SL) e com adição de lúpulo por *dry hopping* (CL) de acordo com as horas decorridas/unidades de pasteurização e valores expressos em porcentagem de inibição e em $\mu\text{mol TE/L}$.

Medidas de tempo		% inibição		$\mu\text{mol TE/L}$	
Horas	UPS	SL	CL	SL	CL
0	0	4,80	-18,73	-3,97	-3,73
6	13	9,22	-21,13	-4,02	-3,70
12	27	0,86	20,75	-3,93	-4,14
18	40	3,75	14,41	-3,96	-4,07
24	54	9,03	-20,56	-4,02	-3,71
30	67	-26,32	12,39	-3,65	-4,05
36	81	-42,84	15,56	-3,48	-4,09
42	94	-2,21	1,63	-3,90	-3,94
48	108	-39,48	20,08	-3,51	-4,13
60	135	-14,22	22,57	-3,78	-4,16
72	162	-38,04	20,94	-3,53	-4,14
84	189	-4,71	22,96	-3,87	-4,16
96	215	-38,62	20,08	-3,52	-4,13
108	242	-23,05	28,05	-3,68	-4,22
120	269	-8,07	-10,57	-3,84	-3,81
132	296	-35,64	12,01	-3,55	-4,05
144	323	-40,35	11,34	-3,50	-4,04

Fonte: Maas, 2019.

Como demonstrado na Tabela 3, tanto para as cervejas SL quanto para as CL, os valores da porcentagem de inibição deram em sua maioria negativos, sendo isso predominante nas cervejas SL. Já com os dados expressos em $\mu\text{mol TE/L}$, todos eles foram negativos. Tais resultados diferem dos encontrados na literatura, em que não houve valores negativos para amostras de cervejas do mesmo tipo (CAO et al., 2011;

PAI et al., 2015) e nem em amostras de cervejas diferentes (ZHAO et al., 2010). Com relação às cervejas CL, embora a maioria dos valores da sua porcentagem de inibição tenham sido positivos, não houve consistência do resultado, tendo em vista que o esperado era que, com o aumento do tempo, a capacidade antioxidante diminuísse, ou seja, a porcentagem de inibição decaísse. Tal hipótese não é sustentada pelos dados apresentados, tendo em vista que, ao invés de valores lineares com a diminuição da capacidade antioxidante, o obtido foram valores aparentemente aleatórios, os quais não possibilitaram traçar uma correlação.

Tendo em vista que esta etapa experimental foi realizada em um espectrofotômetro com leitura em placa, suspeita-se de que tais resultados se deram devido às pequenas quantidades depositadas nos poços, que tornaram o experimento suscetível a erros. Por isso, esta etapa deve ser repetida em novos estudos, a fim de gerar dados mais verossímeis e consoantes com a literatura para embasarem conclusões mais sólidas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados revelaram que, com o aumento do tempo em aquecimento, a absorção térmica acumulada acelerou reações nas cervejas que impulsionaram o envelhecimento das mesmas, de forma constante e crescente, mostrando que a temperatura escolhida (50 °C) foi suficiente para a avaliação do envelhecimento em relação ao tempo.

A avaliação do parâmetro cor é um indicativo de qualidade da cerveja no processo de envelhecimento, tendo em vista sua associação com reações químicas de oxidação.

Com relação ao pH, a variação em decorrência do aquecimento foi pequena, mas claramente nota-se que a cerveja submetida à adição de lúpulo a frio (*dry hopping*) apresentou um pH maior que a cerveja sem adição de lúpulo a frio.

Quando comparadas com as cervejas sem adição de lúpulo a frio, as cervejas com adição de lúpulo na etapa de *dry hopping* aparentaram ser mais estáveis, tendo em vista que escureceram menos que as cervejas sem lúpulo. Tal efeito sugere uma característica estabilizante da adição de lúpulo na etapa de *dry hopping* nas cervejas. Esse efeito estabilizante pode ser causado pela capacidade anti-radicalar das cervejas, que não foram evidenciados através do ensaio anti-radicalar do radical DPPH, neste trabalho, mas que poderão ser evidenciados em trabalhos futuros.

REFERÊNCIAS

- ALMAGUER, C; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Humulus lupulus—a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289-314, 2014.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. Ed. EDGARD BLUCHER Ltda. São Paulo, Vol. 4, 2001.
- ARON, P. M.; SHELLHAMMER, T. H. A discussion of polyphenols in beer physical and flavour stability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, n. 4, p. 369-380, 2010.
- BAMFORTH, Charles; RUSSELL, Inge; STEWART, Graham. **Beer: A quality perspective**. Academic press, 2011.
- BERNSTEIN, L.; WILLOX, J. C. Água. **El cervecero en la practica**. Asociación Latinoamericana de Fabricantes de Cerveza, Lima, Peru. Cap. v. 4, p. 53-82, 1977.
- BOTELHO, B. G. **Perfil e teores de aminos bioativas e características físico-químicas em cervejas**. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2009.
- BRASIL. Decreto nº 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e a fiscalização da produção e do comércio de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 04 de junho de 2009.
- CALLEMIEN, Delphine; COLLIN, Sonia. Involvement of flavanoids in beer color instability during storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 55, n. 22, p. 9066-9073, 2007.
- CAO, Lei et al. Influence of pasteurising intensity on beer flavour stability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 4, p. 587-592, 2011.
- CEH, Barbara et al. Relationships between xanthohumol and polyphenol content in hop leaves and hop cones with regard to water supply and cultivar. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 8, n. 9, p. 989-1000, 2007.
- CERVBRASIL, **Associação Brasileira da Indústria da Cerveja**. Disponível em: < http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/ > Acesso em: 23 mar. 2019.
- CLARK, Shawn M. et al. Transcriptome analysis of bitter acid biosynthesis and precursor pathways in hop (*Humulus lupulus*). **BMC plant biology**, v. 13, n. 1, p. 12, 2013.
- COLLIN, Sonia et al. Polyphenols and beer quality. **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**, p. 2333-2359, 2013.

COUTINHO, C. A. T.; QUINTELLA, C.; PANZANI, M. **A história da cerveja no Brasil**. v. 5. Cervesia. 2008. Disponível em: <<http://www.cervesia.com.br/historia-da-cerveja/72-a-historia-dacerveja-no-brasil.html>>. Acesso em: 03 março. 2019.

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

DVORAKOVA, M.; MOREIRA, M. M.; DOSTALEK, P.; SKULILOVA, Z.; GUIDO, L. F.; BARROS, A. A. Characterization of monomeric and oligomeric flavan-3-ols from barley and malt by liquid chromatography-ultraviolet detection-electrospray ionization mass spectrometry. **J. Chromatography A**. 1189(1-2), 398-405. 2008.

ENGAN, Sigmund. SOME CHANGES IN BEER FLAVOUR DURING AGEING. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 75, n. 4, p. 371-376, 1969.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. Analysis Committee. Analytica-EBC: Method 8.5 revised Oct. 2000. London: Elsevier, 78 p. 1963.

EVANGELISTA, R. R. **Análise do processo de fabricação industrial de cerveja**. Monografia, 2012.

FU, B.; LABUZA, T. P. Shelf-life prediction: theory and application. **Food Control**, v.4, n.3, p.125- 133. 1993.

GERHÄUSER, Clarissa. Beer constituents as potential cancer chemopreventive agents. **European Journal of Cancer**, v. 41, n. 13, p. 1941-1954, 2005.

GIMÉNEZ, A.; ARES, F.; ARES, G. Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. **Food Research International**, v. 49, p.311–325. 2012.

GONZÁLEZ-GROS, M.; LEBRÓN, M. R.; MARCOS, A. Revisión bibliográfica sobre los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud. **Centro de Información Cerveza y Salud**, 2000.

HOFF, Signe et al. Storage stability of pasteurized non-filtered beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, n. 3, p. 172-181, 2013.

HORNSEY, Ian Spencer. Brewing. **Royal Society of Chemistry**, 2013.

HUGHES, P. S.; BAXTER, E. D. Beer-quality, safety and nutritional aspects. Cambridge, UK: **The Royal Society of Chemistry**. Cap. 5: Nutricional Aspects of Beer. 2001.

HUMBERSTONE, F. J.; BRIGGS, D. E. Extraction and assay of ferulic acid esterase from malted barley. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 106, n. 1, p. 21-30, 2000.

IAL – INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. v. 4. 4 ed. São Paulo: IMESP, 2008.

JIMÉNEZ PAVÓN, D. et al. Idoneidad de la cerveza en la recuperación del metabolismo de los deportistas. **Centro de información cerveza y salud**. Madrid, 2010.

KANEDA, Hirotaka et al. Free radical reactions in beer during pasteurization. **International journal of food science & technology**, v. 29, n. 2, p. 195-200, 1994.

KEUKELEIRE, D. de. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Quím. Nova**, v. 23, n.1 São Paulo, São Paulo, 2000.

KONDO, K. Preventive effects of dietary beer on lifestyle-related diseases. **EBC Proc.**, Dublin, n. 1, p.133, 2003

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

LABUZA, Theodore P.; SZYBIST, Lynn M. **Open dating of foods**. John Wiley & Sons, 2008.

LAFONTAINE, Scott R.; SHELLHAMMER, Thomas H. Impact of static dry-hopping rate on the sensory and analytical profiles of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 124, n. 4, p. 434-442, 2018.

LI, Hong et al. A study on kinetics of beer ageing and development of methods for predicting the time to detection of flavour changes in beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 121, n. 1, p. 38-43, 2015.

LIMA, Urgel de Almeida; BASSO, Luiz Carlos; AMORIM, Henrique Vianna de. Produção de etanol. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**, 2001.

LIMBERGER, Silvia Cristina. O setor cervejeiro no Brasil: gênese e evolução. **CaderNAU**, v. 6, n. 1, 2013.

LUND, Marianne N. et al. Effect of pasteurization on the protein composition and oxidative stability of beer during storage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 50, p. 12362-12370, 2012.

MALAJOVICH, Maria Antonia. **Biotecnologia 2011**. Rio de Janeiro, Edições da Biblioteca Max Feffer do Instituto de Tecnologia ORT, p. 39-50, 2012.

MALLET, John. Malt: a practical guide from field to brewhouse. **Brewers Publications**, 2014.

MARTÍNEZ, Alejandro et al. Physicochemical characterization of special persimmon fruit beers using bohemian pilsner malt as a base. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 123, n. 3, p. 319-327, 2017.

MEGA, J. F.; NEVES, E.; ANDRADE, C. J. A produção de cerveja no Brasil. **Revista Citino**, v. 1, n. 1, p. 34-42, 2011.

MIKYŠKA, A. et al. The role of malt and hop polyphenols in beer quality, flavour and haze stability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 1, p. 78-85, 2002.

MORADO, R. **Larousse da cerveja**. 1ª Edição. São Paulo: Lafonte, 2009.

MOSHER, Randy. **Mastering Homebrew: The complete guide to brewing delicious beer**. Chronicle Books, 2015.

NIMUBONA, D.; BLANCO, C. A.; CABALLERO, I.; ROJAS, A.; ANDRÉS-IGLESIAS, C. An approximate shelf life prediction of elaborated lager beer in terms of degradation of its iso- α -acids. **Journal of Food Engineering**, V.116, p.138–143. 2013.

NOGUEIRA, L. C. **Estudo comparativo de caracterização e bioatividade de cerveja com e sem álcool**. 2006. Tese de Doutorado. Tese (Doutorado), Instituto de Química. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro Campinas.

OLADOKUN, O. et al. Dry-hopping: The effects of temperature and hop variety on the bittering profiles and properties of resultant beers. **Brew. Sci**, v. 70, p. 187-196, 2017.

OLIVEIRA, Nayara Aline Muniz. Leveduras utilizadas no processo de fabricação da cerveja. Monografia. **Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais**, 2011.

ONATE-JAEN, A.; BELLIDO-MILLA, D.; HERNANDEZ-ARTIGA, M. P. Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. **Food chemistry**, v. 97, n. 2, p. 361-369, 2006.

O'ROURKE, Tim. Colloidal stabilisation of beer. **Brewer International**, v. 2, n. 1, p. 23-5, 2002.

PAI, Tapasya V. et al. Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 3, p. 1414-1423, 2015.

PALMER, John J. How to brew: everything you need to know to brew beer right the first time. **Brewers Publications**, 2006.

PINTO, Carmen et al. Xanthohumol prevents carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 10, p. 3405-3412, 2012.

RODRIGUES, M. C. P. **Perfil sensorial e aceitação de cervejas comercializadas no mercado brasileiro – treinamento e monitoramento de julgadores**, 2001, 196p, Tese (Doutor em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas 2000.

RYBKA, Ana Cecilia Poloni. **Folatos, capacidade antioxidante e trans-2-nonenal em cerveja brasileira**. 2010. 160 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em:

<<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/254275>>. Acesso em: 21 março 2018.

SANTOS, J. R. et al. Determination of E-2-nonenal by high-performance liquid chromatography with UV detection: Assay for the evaluation of beer ageing. **Journal of Chromatography A**, v. 985, n. 1-2, p. 395-402, 2003.

SINDICERV. **O setor em números**. Disponível em: <<http://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros.php>>. Acesso em 23 mar. 2019.

SINGH R.P. Scientific principles of shelf life evaluation. In: Man C.M.D., Jones A.A. (eds) **Shelf Life Evaluation of Foods**. Springer, Boston, MA. 1994.

SMITH, B. J. **BeerSmith** Home Brewing Software, Recipes, Forum, Blog, Podcast and More. Disponível em: < <http://beersmith.com/> >. Acesso em: fev. 2019.

SMYTHE, J. E.; O'MAHONY, M. A.; BAMFORTH, C. W. The impact of the appearance of beer on its perception. **J. Inst. Brew.** 108(1):37–42, 2002.

SOUZA, Deise Ferreira de. A cor da cerveja. **O Caneco**. 2016. Disponível em: <<https://www.ocaneco.com.br/cor-da-cerveja/>>. Acesso: 20 de março de 2019.

SPEAROT, Joseph William. **Influence of Beer Color on Perception of Bitterness**. 2016. Tese de Doutorado. Drexel University.

STEVENS, Jan F. et al. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 6, p. 2421-2428, 1999.

TEIXEIRA, J.; CRUZ, J. Produção de cerveja. **Reatores Biológicos Fundamentos e Aplicações**. Lidel-Edições Técnicas Lda, 2014.

VANDERHAEGEN, Bart et al. Aging characteristics of different beer types. **Food chemistry**, v. 103, n. 2, p. 404-412, 2007.

VANDERHAEGEN, Bart et al. Influence of the brewing process on furfuryl ethyl ether formation during beer aging. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, n. 22, p. 6755-6764, 2004.

VANDERHAEGEN, Bart et al. The chemistry of beer aging—a critical review. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 357-381, 2006.

VARNAM, A.; SUTHERLAND, J. M. Beverages: technology, chemistry and microbiology. **Springer Science & Business Media**, 1994.

VINSON, Joe A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: beers and the effect of two types of beer on an animal model of atherosclerosis. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 51, n. 18, p. 5528-5533, 2003.

ZHAO, Haifeng et al. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 1150-1158, 2010.

GLOSSÁRIO

Adjunto cervejeiro: ingrediente que poderá ser utilizado na produção de cervejas em substituição parcial ao malte.

Brassagem: etapa da fabricação de cerveja que consiste, basicamente, de misturar o malte e a água, sob a ação do calor.

Caramelização: escurecimento não enzimático que acontece devido á degradação de açúcares em ausência de aminoácidos ou proteínas, em meio ácido ou alcalino.

Floculação: processo químico e físico de agregação de partículas pequenas em partículas maiores que tendam a decantar.

Mosto: mistura açucarada destinada à fermentação alcoólica.

Mosturação: etapa da produção do mosto que será fermentado posteriormente para obtenção da cerveja. Dela, faz parte a *brassagem*.

Pasteurização: processo no qual o produto é submetido a altas temperaturas e em seguida resfriado, utilizado a fim eliminar ou reduzir ao mínimo a concentração de micro-organismos que podem deteriorar alimentos e bebidas.

Reação de Maillard: reação química entre um aminoácido ou proteína e um carboidrato redutor, obtendo-se produtos que dão sabor, odor e cor aos alimentos.