

**INSTITUTO FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CURSO DE BACHARELADO EM BIOMEDICINA**

**LARA AZEVEDO MARTINS**

**PADRONIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE EM  
LABORATÓRIO CERVEJEIRO: UM ESTUDO APLICADO**

**VILA VELHA  
2022**

**LARA AZEVEDO MARTINS**

**PADRONIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE EM  
LABORATÓRIO CERVEJEIRO: UM ESTUDO APLICADO**

Monografia apresentada à  
Coordenadoria do Curso de  
Bacharelado em Biomedicina do  
Instituto Federal do Espírito Santo,  
Campus Vila Velha, como requisito  
parcial para a obtenção do título de  
Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Juliano Souza  
Ribeiro.

**VILA VELHA  
2022**

(Biblioteca do Campus Vila Velha)

M386p Martins, Lara Azevedo.

Padronização e controle de qualidade em laboratório cervejeiro : um estudo aplicado. / Lara Azevedo Martins. - 2022.  
68 f. : il. ; 28 cm.

Orientador: Juliano Souza Ribeiro

TCC (Graduação) Instituto Federal do Espírito Santo, Campus Vila Velha, Curso de Biomedicina, 2022.

1. Cerveja. 2. Controle de qualidade. 3. Análise. I. Ribeiro, Juliano Souza. II. Título III. Instituto Federal do Espírito Santo.

CDD: 641.23

Bibliotecário/a: Camila Rodrigues Quaresma Martins CRB6-ES nº 963



ATA DE DEFESA Nº 16/2022 - VVL - CCBB (11.02.34.01.08.02.10)

Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO

Vila Velha-ES, 19 de dezembro de 2022.

### ATA DE DEFESA DE TCC

Ao primeiro dia do mês de dezembro do ano de 2022, a banca presidida pelo professor Dr. Juliano Souza Ribeiro e composta pela Profa. Dra. Juliana Gomes e Profa. Dra. Ana Raquel Santos de Medeiros Garcia, reuniu-se para a defesa do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado “PADRONIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE EM LABORATÓRIO CERVEJEIRO: UM ESTUDO APLICADO”, apresentado por Lara Azevedo Martins do Curso Superior de Biomedicina. Após a apresentação do trabalho e arguição, a banca examinadora deliberou concluindo pela **APROVAÇÃO** do Trabalho de Conclusão de Curso, desde que o(s) estudante(s) entreguem o Trabalho de Conclusão de Curso corrigido, conforme as considerações realizadas pela Banca Examinadora e sob supervisão do orientador, à Biblioteca Zilma Coelho Pinto do Ifes/Vila Velha, como requisito necessário para solicitação de colação de grau. A banca examinadora, ainda, atribuiu nota 100 ao trabalho.

*(Assinado digitalmente em 22/12/2022 15:04)*  
ANA RAQUEL SANTOS DE MEDEIROS GARCIA  
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO  
VVL-EDUCIMAT (11.02.34.01.07.08)  
Matricula: 1529637

*(Assinado digitalmente em 19/12/2022 21:09)*  
JULIANA GOMES ROSA  
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO  
VVL-CCTQ (11.02.34.01.08.02.06)  
Matricula: 1863289

*(Assinado digitalmente em 19/12/2022 17:41)*  
JULIANO SOUZA RIBEIRO  
PROFESSOR DO ENSINO BASICO TECNICO E TECNOLOGICO  
VVL-CMPQ (11.02.34.01.07.07)  
Matricula: 1813880

*(Assinado digitalmente em 22/12/2022 06:07)*  
LARA AZEVEDO MARTINS  
DISCENTE  
Matricula: 9999302141

Processo Associado: 23187.005424/2022-49

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ifes.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 16, ano: 2022, tipo: ATA DE DEFESA, data de emissão: 19/12/2022 e o código de verificação: 147b8dce04

## AGRADECIMENTOS

Dedico o primeiro parágrafo deste agradecimento à minha própria fé e espiritualidade. Ao meu Deus protetor dos meus dias, aos meus orixás, guias do meu destino, às minhas entidades protetoras, por iluminarem os caminhos que me trouxeram até aqui. Aos pretos velhos, malandros e erês, sou grata por toda a belíssima sabedoria, malandragem e caminhos abertos. Na companhia da fé sei que não ando só! *“Andar com fé eu vou, que a fé não costuma faiá”!*

Adilma, minha mãe, uma pessoa à frente do seu tempo, minha amiga e grande incentivadora dessa linda jornada. Não caberiam em um livro palavras suficientes para descrever a minha gratidão por você, mas eu juro que neste trabalho couberam as entrelinhas de cada palavra tua de carinho e cuidado que foi capaz de confortar a minha alma, a luz dos teus cabelos lindos e o prazer de uma boa risada com café e bolo na palha de milho. Neste trabalho tem os traços do meu amor enorme e infinito por você, mamãe, estamos juntas em tudo, para sempre, muito, muito obrigada!

Ao meu pai, Gilmar, minha grande inspiração de vida, eu agradeço por cada ato de amor, por cada conselho, cada linda conversa cercada daquele churrasco no quintal e aquela cerveja gelada que só você sabe o ponto! Agradeço à Deus pelo apoio financeiro que o suor do seu trabalho me proporcionou. Essa vitória também é sua, Gilmar. Felicidade na minha vida é ouvir as pessoas me dizerem *“nossa, você tem o jeito do seu pai”!* Pai, em mim vejo muito de você, e que orgulho espalhar a sua sensibilidade, amor e empatia por aí!

Aos meus irmãos belíssimos, grandes amores da minha vida, obrigada por todos os momentos que compartilhamos juntos. Luma, você que é uma pessoa *“que eu sei que tem coração, e que faz arte especialmente por amor”*, estreitar a nossa relação e te sentir sempre próxima de mim durante esse caminho foi um incentivo colossal, sabe que *“eu fico um tempão sem te ver mas esse amor permanece vivo”*. Meu pequeno grande Pedro, obrigada pela parceria, pelas horas de papo e séries com pipoca na madrugada! Estou com você pra tudo, nós por nós sempre. Acompanhar, mesmo de longe, a jornada de cada um de vocês só aumenta o meu amor e admiração, vamos juntos!

Renata, meu bem, minha companheira de vida, de rotina, de afetos. Que caminho lindo e doce nós construímos juntas. Agradeço por ser apoio emocional, pelos cafés da manhã sagrados, agradeço pelo raciocínio matemático impecável, pelas planilhas e por me tirar tantas risadas sinceras mesmo nos momentos mais difíceis. Rê, te agradeço por ser família. O nosso amor a gente inventa, reinventa e assim refazemos o nosso laço, um dia após o outro, devagar e sempre. *“Meu riso é tão feliz contigo, o meu melhor amigo é o meu amor”*.

Minha amiga de longa data, Paula, agradeço pelo carinho e tantas risadas em cada açai na pracinha, estar com você é estar em casa, nossa amizade é um belo laço que eu tenho com a planície goitacá, te amo! Aos parceiros de jornada acadêmica, meus amigos “estrangeiros”, de longe viemos e ainda mais longe nós vamos, vida longa ao nosso sucesso! *“É tão dez que junto todo stress é miúdo [...] quem tem um amigo tem tudo”!*

Por fim, aos mestres educadores do meu querido IFES campus Vila Velha, fica a minha gratidão pelos aprendizados dentro e fora de sala de aula, por incentivarem o respeito e a educação crítica e libertadora. Em especial Carine, que foi professora, coordenadora de curso e amiga, obrigada por confiar no meu potencial de uma forma tão extraordinária. Juliano, meu orientador neste projeto belíssimo e mestre cervejeiro preferido, que inteligência excepcional, valeu, chefe!

*A sensibilidade é o nosso maior feitiço.*

*(Autor desconhecido)*

## RESUMO

O presente trabalho trata da relevância da padronização de análises e do controle de qualidade na produção cervejeira, principalmente na produção artesanal, na qual o menor porte no processo produtivo por vezes dificulta a análise coerente de alguns parâmetros importantes como o amargor (IBU) e a cor (EBC) do produto final. Com os objetivos de estudar essa problemática e abordá-la no contexto da padronização de processos dentro do Laboratório de Cervejas e Matérias-Primas (LACEMP) no IFES campus Vila Velha, visando torná-lo um laboratório de referência no estado do Espírito Santo, foram produzidos alguns Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) com base nas normas da *Analytica EBC (European Brewery Convention)*. Foram estudados a teoria e os procedimentos para análise de amargor, cor, dicetonas vicinais, polifenóis e flavonoides. Quatro amostras de cervejas artesanais foram compradas em supermercado e utilizadas para as análises de amargor e cor em laboratório, resultando em 2 valores de amargor (IBU) discordantes com os rótulos. Assim, os resultados foram discutidos e concluiu-se sobre a importância da padronização e frequência de realização na rotina de uma cervejaria e/ou laboratório cervejeiro.

Palavras-chave: Padronização. Análises. Cerveja. Qualidade. Procedimento Operacional Padrão.

## ABSTRACT

The present project deals with the relevance of standardization of analyzes and quality control in brewing production, mainly in craft beer production, in which the smaller size in the production process sometimes disturbs the coherent analysis of some important parameters such as bitterness (IBU) and color (EBC) of the final product. With the aim of studying this issue and addressing it in the context of standardization of processes within the Laboratory of Beers and Raw Materials (LACEMP) at the IFES campus Vila Velha, aiming to make it a reference laboratory in the state of Espírito Santo, were produced some Standard Operating Procedures (SOPs) based on Analytica EBC (European Brewery Convention) standards. The theory and procedures for analyzing bitterness, color, vicinal diketones, polyphenols and flavonoids were studied. Four craft beer samples were purchased at a supermarket and used for laboratory analysis of bitterness and color, resulting in 2 bitterness values (IBU) discordant with the labels. Thus, the results were discussed and it was concluded on the importance of standardization and frequency of realization in the routine of a brewery and/or brewing laboratory.

Keywords: Standardization. Analytics. Beer. Quality. Standard operational procedure.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	09
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	12
2.1. <b>OBJETIVO GERAL</b> .....	12
2.2. <b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	12
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	13
<b>4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	15
4.1. Matérias-primas.....	15
4.2. Tipos de cerveja.....	18
4.3. Processamento.....	18
4.4. Parâmetros físico-químicos.....	21
4.5. Controle de qualidade e POPs.....	30
<b>5. METODOLOGIA</b> .....	33
5.1 Planejamento experimental.....	33
5.2 Análise de amargor (IBU).....	33
5.3 Análise de cor (EBC).....	34
5.4 Confeccção dos POPs.....	34
<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	36
6.1 Amargor (IBU).....	37
6.2 Cor (EBC).....	40
6.3 Elaboração dos POPs.....	43
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	44
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>APÊNDICE A - PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO</b> .....	49

## 1. INTRODUÇÃO

A água, o malte, o lúpulo e a levedura são os quatro ingredientes principais que definem a fabricação da cerveja, uma bebida alcoólica fermentada e aromatizada (KEUKELEIRE, 2000). O teor alcoólico proveniente dessa bebida é obtido a partir do processo natural de fermentação do mosto de malte de cevada e água potável por ação de leveduras, e a partir da adição de outros adjuntos cervejeiros, mas principalmente o lúpulo, onde nesse caso, a cerveja alcança os teores de amargor e aromas agradáveis característicos da bebida (GUERREIRO, 2007).

Há 5000 anos os sumérios e assírios utilizavam o processo de malteação de grãos para produzir uma bebida fermentada a partir de cereais (GUERREIRO, 2007). Em decorrência à sua longa história, a produção cervejeira é própria do que é conceituado como biotecnologia tradicional (DRAGONE, MUSSATTO e SILVA, 2007). Embora os processos de (I) malteação, (II) produção do mosto cervejeiro, (III) fermentação e (IV) processamento final (estabilização, engarrafamento, etc) sejam consistentes para definir a base da produção de cerveja, as possibilidades de variação na elaboração de uma receita, utilização de aditivos de maturação, textura, sabores e aromas, assim como aprimoramentos no próprio processamento, são os fatores responsáveis pelo avanço do interesse em inovações voltadas ao mercado cervejeiro (KEUKELEIRE, 2000; DRAGONE, MUSSATTO e SILVA, 2007).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), apresenta no Anuário da Cerveja de 2020 (MAPA, 2021) que esse foi o primeiro ano em que todas as Unidades da Federação (UF) passaram a ter uma cervejaria, o que ocorreu com a abertura da primeira cervejaria do Acre. Além disso, já no ano de 2021 foi alcançada a marca de 1549 cervejarias registradas no MAPA, o que representa um aumento de 12,0% em relação ao ano anterior, quando haviam 1.383 cervejarias registradas (MAPA, 2022). O Anuário ainda apresenta dados da Densidade Cervejeira por UF, na qual o Espírito Santo ocupa o 3º lugar, com 72.079 habitantes por cervejaria (MAPA, 2022).

Por definição, de acordo com a Lei nº 13.097/15 (BRASIL, 2015) e o Decreto nº 8.442 (BRASIL, 2015), cervejaria artesanal é aquela que produz até 20 milhões de litros por ano e cerveja artesanal é aquela que possui em sua receita, no mínimo,

75% de malte de cevada. Em 2016 foi sancionada a Lei Complementar Nº 155, a qual incluiu as micro e pequenas cervejarias - aquelas que faturam até R\$4,8 milhões por ano - no regime tributário do Simples Nacional, desburocratizando algumas questões tributárias envolvidas na comercialização de cerveja (BRASIL, 2016).

Nesse sentido, no caminho da ascensão de micro e pequenas produções direcionadas aos produtos e serviços artesanais, a indústria da cerveja artesanal apresenta no Brasil um desempenho promissor, caracterizado, por exemplo, pela representação de 2% do PIB (Produto Interno Bruto) do país. As particularidades de um produto único, personalizado, de maior qualidade e complexidade sensorial conferem à cerveja artesanal essa posição de destaque (FISPAL, [s.d]).

As produções artesanais cervejeiras enfrentam, de maneira geral, os desafios de trabalhar com produtos cujo processamento requer manejos e cuidados especiais por serem obtidos por alguns procedimentos e principalmente receitas originais, que convêm ao porte financeiro e também criativo de quem produz. Dessa forma, é importante pensar e ressaltar quais são os possíveis métodos que aprimoram a produção e garantem o controle de qualidade do produto final (BRIGGS *et al*, 2004).

A história e a ciência, juntas, apontam a relevância da padronização de processos:

Em 1883, o cientista dinamarquês Emil Christian Hansen isolou as primeiras culturas puras de levedura, iniciando sua utilização de maneira controlada. Esse procedimento conferiu à cerveja muito maior constância de sabor e qualidade. Todos esses avanços, aliados ao início da produção industrial do frio, lançaram as bases para o desenvolvimento da indústria cervejeira moderna (GUERREIRO, 2007).

Os requisitos e procedimentos necessários para o registro de estabelecimento produtor de cerveja são determinados pela Instrução Normativa nº 72/18 (MAPA, 2018), a qual exige: os dados gerais do estabelecimento, documentos do responsável legal, documentos do responsável técnico e documentos do estabelecimento. Neste último, são solicitados: (I) alvará de licença para localização emitida pelo órgão municipal ou DF, (II) certificado de registro de estabelecimento, quando possuir registro anterior e desde que este ainda esteja válido, (III) cópia da Inscrição Estadual, (IV) cópia de Contrato Social ou Estatuto, (V) cópia do CNPJ, (VI) laudo de análise de potabilidade de água, (VII) manual de boas práticas de

fabricação, (VIII) memorial descritivo das instalações e equipamentos e (IX) projeto (planta) do estabelecimento (MAPA, 2018; SINDICERV [s.d]).

Isto posto, entende-se que o laudo de análise e potabilidade de água é o único parâmetro físico-químico de análise necessário para registrar uma cervejaria no Brasil, enquanto outros parâmetros importantes para a qualidade final do produto desejado não são estabelecidos em lei pelo MAPA. Isso corrobora a situação de muitas cervejarias estabelecerem parâmetros de cor e amargor, por exemplo, apenas de acordo com as informações das matérias-primas adicionadas a programas automatizados como o BeerSmith, sem ter um controle de qualidade físico-químico real, o que interfere na originalidade, complexidade e qualidade do produto final desejado.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Elaborar a padronização de processos nas análises físico-químicas feitas pelo Laboratório de Análises de Cervejas e Matérias-Primas (LACEMP) no IFES campus Vila Velha, a fim de visar o laboratório como referência no estado do Espírito Santo, por meio do controle de qualidade dos produtos e serviços oferecidos.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Elencar parâmetros físico-químicos de cervejas a partir de protocolos internacionais oficiais.
- Padronizar esses protocolos internacionais aos equipamentos, materiais e insumos disponíveis no LACEMP.
- Realizar análises de amargor (IBU) e cor (EBC) a partir de amostras rotuladas.
- Elaborar Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) e ajustar para serem utilizados pelo LACEMP.

### 3. JUSTIFICATIVA

Como uma bebida presente no cotidiano brasileiro e de grande aceitação, a cerveja - no manejo do presente estudo, a cerveja artesanal - movimentou o mercado financeiro do país, e sua produção está em ascensão no Espírito Santo, levando o estado a posições de destaque nos âmbitos produtivos.

Analisando este cenário como promissor mediante ao aumento na produtividade de cerveja, e pensando em aprimoramento, inovação e qualificação profissional, surge em 2019 o Laboratório de Análise de Cervejas e Matérias-Primas (LACEMP) no IFES campus Vila Velha, coordenado pelo professor Dr. Juliano Souza Ribeiro, com o auxílio de docentes e discentes, dos cursos técnicos, de graduação e pós-graduação do IFES campus Vila Velha.

O interesse pela biotecnologia, bioquímica e química envolvidas na produção de cerveja e suas matérias-primas - água, malte, lúpulo e levedura - deu luz às primeiras brassagens - etapa inicial da produção cervejeira, na qual os cereais maltados são cozidos em água quente -, que resultaram em cervejas de boa palatabilidade, complexidade e corroboraram as primeiras análises físico-químicas feitas pelo LACEMP.

Em 2019, o projeto do campo experimental de lúpulo do IFES Vila Velha foi posto em prática na cidade de Viana, e a partir das colheitas, muito bem sucedidas, passou a ser possível a produção de cervejas utilizando como matéria-prima as variedades de lúpulo plantadas e colhidas pelos próprios integrantes do laboratório. Além disso, os parâmetros de qualidade do lúpulo também passaram a ser analisados (VERÍSSIMO *et al.*, 2022). Em 2022 foi inaugurado no campus o prédio de extensão tecnológica, que expandiu o espaço físico e o porte de equipamentos do LACEMP, e nesse contexto surgiu a ideia desse projeto.

A partir dos avanços descritos, do crescimento do laboratório em equipamentos, materiais, matéria-prima, equipe e sobretudo das parcerias do LACEMP com outros campi, cervejarias locais e prefeituras, ocorre a necessidade da padronização das análises das cervejas produzidas e também solicitadas por cervejeiros parceiros, bem como das análises do lúpulo do campo experimental.

Com o objetivo de inserir a biomedicina e suas áreas afins - bromatologia, controle de qualidade, bioquímica e biotecnologia - para sanar essa problemática, o presente trabalho almeja a elaboração de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) com enfoque em análise de cor (EBC), amargor (IBU) e alcoometria (ABU) em cerveja e  $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos em lúpulo, baseados em protocolos oficiais internacionais e adaptados à realidade do campus e do LACEMP.

## 4. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 4.1. Matérias-primas

#### Água

Como componente principal da cerveja, a água é a matéria-prima mais importante na sua fabricação, e por isso é importante ressaltar que suas características físico-químicas são fundamentais para a garantia da qualidade da cerveja (JUNIOR, VIEIRA e FERREIRA, 2009).

Nesse sentido, ocorre que a escolha do local para instalação de uma cervejaria precisa considerar a qualidade da água, caso contrário pode necessitar de tratamentos e correções mais minuciosas, o que apesar de ser uma realidade comum em cervejarias de grande porte, acaba resultando em aumento de custos (GUERREIRO, 2007).

Para a fabricação de cerveja, a água utilizada, obrigatoriamente, deve ser potável, e como já citado, pode sofrer correções químicas conforme necessidades em sua composição. Por exemplo, na produção de cervejas mais adoçadas e escuras, associa-se o uso de águas com maiores teores de carbonato de cálcio, por outro lado, cervejas de características mais amargas são associadas às águas com elevados teores de sulfato de cálcio (JUNIOR, VIEIRA e FERREIRA, 2009). Ainda de acordo com JUNIOR, VIEIRA e FERREIRA (2009):

Muito do sucesso de certas cervejas deve-se às características da água com que são produzidas. Por exemplo, a cerveja produzida em *Pilsen* na Tchecoslováquia ficou famosa porque a água utilizada em sua produção apresentava uma característica peculiar com baixíssima salinidade o que conferia a bebida um paladar especial que conquistou fronteiras chegando a originar um tipo de cerveja conhecido no mundo inteiro como, “cerveja tipo *Pilsen*” (JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009).

Os parâmetros estabelecidos e exigidos pelo MAPA no laudo de análise físico-química e microbiológica para uma boa qualidade de água incluem: (I) cor, (II) turbidez, (III) pH, (IV) coliformes fecais e (V) cloro residual, atestando sua potabilidade (BRIGGS *et al.*, 2004; ARAÚJO, 2016; MAPA, 2018).

O padrão de potabilidade de acordo com o Índice de Qualidade das Águas (IQA), Ministério da Saúde e MAPA indica os seguintes resultados necessários: (I)

cor: intensidade de cor <5 unidades; (II) turbidez: <1 unidade; (III) pH: 6,0 a 9,5; (IV) coliformes fecais: ausência de coliformes totais e *Escherichia coli* em 100 mL; (V) cloro residual: máximo de 2 mg/L (FUNASA, 2013; MS, 2021). Nessa pesquisa, as análises dos parâmetros de qualidade de água não serão abordados mediante a ausência de equipamentos necessários no LACEMP, mas estabelece-se como objetivo para pesquisas e trabalhos desenvolvidos futuramente.

### **Malte**

O malte é um produto obtido pela germinação parcial dos grãos de cereais, é rico em açúcares e por isso coloca-se como ingrediente de qualidade primordial no processo de fermentação (GUERREIRO, 2007). Em 1516, Guilherme IV (1493-1550), duque da Baviera, na Alemanha, gritou a primeira regulamentação sobre a cerveja no país, a chamada *Reinheitsgebot*, ou Lei da Pureza da Cerveja Alemã, a qual estabelecia que toda cerveja produzida na Alemanha deveria conter apenas água, cevada e lúpulo - a ação da levedura só foi descrita em 1800 e então incluída na lei de pureza em 1952 (DUTRA, 2019).

O malte de cevada utilizado na cerveja é, portanto, o grão de cevada que foi submetido a um processo de germinação controlada, a fim de desenvolver enzimas e modificar o amido, tornando-o mais macio e solúvel (JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009).

Portanto, entende-se que qualquer cereal pode sofrer os processos de maltagem - malte de trigo, centeio, aveia e cevada -, mas em produção cervejeira, a primeira escolha se faz pelo malte de cevada, e especificamente a cerveja artesanal precisa possuir em sua receita, no mínimo, 75% de malte de cevada (JUNIOR, VIEIRA e FERREIRA, 2009; BRASIL, 2015).

Em contrapartida à Lei da Pureza da Cerveja Alemã e conseqüentemente ao que se espera de um produto final, ocorrem algumas adaptações decorrentes da redução da cevada e da adição de outros adjuntos relacionados - normalmente maltes mais baratos - com o intuito de reduzir custos.

Nesse projeto, as análises dos parâmetros de qualidade do malte não serão abordados mediante a ausência de equipamentos necessários no LACEMP, mas estabelece-se como objetivo para pesquisas e trabalhos desenvolvidos futuramente.

## Lúpulo

O lúpulo da espécie *Humulus lupulus*, é uma trepadeira perene cujas flores/cones fêmeas são ricas em: (I) resinas, responsáveis pelo amargor; (II) polifenóis, que têm propriedades antioxidantes; e óleos essenciais, relacionados com o aroma. Apenas as flores não fertilizadas das plantas fêmeas do lúpulo são de interesse para a produção cervejeira, isso ocorre porque somente nelas são encontradas quantidades significativas de glândulas de lupulina, responsáveis pela secreção da lupulina, um pó amarelo que contém as substâncias químicas já citadas de interesse (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

Em torno de 97% do lúpulo produzido é destinado à produção cervejeira, e esse índice alto diz respeito às características de: (I) aroma, (II) amargor, (III) estabilidade coloidal, (IV) atividade antioxidante e (V) atividade antimicrobiana que o lúpulo confere à cerveja. Nesse sentido, ao variar apenas a quantidade e/ou variedade de lúpulo utilizando uma mesma receita como base, é possível obter como produto final cervejas de características de amargor e aroma significativamente distintas, conferindo complexidade sensorial e originalidade (ARAÚJO, 2016; GUERREIRO, 2007).

Na fração das resinas macias estão os ácidos amargos do lúpulo, uma mistura constituída de  $\alpha$ -ácidos e  $\beta$ -ácidos. Estes, chamados respectivamente de humulonas e lupulonas, podem corresponder de 5 a 21% da massa total do lúpulo em base seca. Logo, de acordo com DURELLO, SILVA e BOGUSZ (2019):

No processo cervejeiro, os lúpulos de amargor, isto é, lúpulos que apresentam mais de 10% de  $\alpha$ -ácidos, são adicionados no início da etapa de fervura do mosto. Durante a fervura, que ocorre por 45 a 60 minutos em média, as humulonas sofrem um processo de isomerização originando os iso- $\alpha$ -ácidos ou iso-humulonas, que são mais amargos e mais solúveis em água que as humulonas.<sup>28</sup> A isomerização é uma reação favorecida em temperaturas elevadas ( $\geq 100$  °C) e, durante este processo, cada humulona gera seus dois diastereoisômeros na forma cis-iso-humulona e trans-iso-humulona (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

As análises dos parâmetros de qualidade do lúpulo não serão abordadas especificamente, porém, a pesquisa dessa temática já é uma realidade no LACEMP, com pesquisas e análises em andamento a partir do plantio no campo experimental sediado na cidade de Viana.

## Levedura

Leveduras são utilizadas como fermento na produção cervejeira em razão da capacidade de realizarem fermentação alcoólica e transformarem açúcares fermentáveis em álcool. As espécies mais utilizadas são do gênero *Saccharomyces*, para alta fermentação (*Ale*) a *Saccharomyces cerevisiae* e para a baixa fermentação (*Lager*) a *Saccharomyces pastorianus* (GUERREIRO, 2007).

Cada cervejaria tem suas próprias escolhas de cepa a serem utilizadas na etapa de fermentação, pois apesar de todas realizarem basicamente a transformação de açúcares em álcool e gás carbônico, podem ocorrer variações de sabor e aroma provenientes das diferenças de metabolismo (JUNIOR, VIEIRA e FERREIRA, 2009).

As análises dos parâmetros de qualidade de levedura não serão abordadas especificamente, porém, a pesquisa dessa temática já é uma realidade no LACEMP, com pesquisas vinculadas a cervejarias parceiras em andamento.

### 4.2. Tipos de cerveja

A cerveja provém de três famílias de produção: as de (I) baixa fermentação, denominadas tipo *Lager*, as de (II) alta fermentação, chamadas *Ale* e as cervejas de fermentação espontânea, são fatores de variação: (I) o tempo de fermentação, (II) a temperatura e (III) a cepa de levedura utilizada. As *Lager* possuem um maior período fermentativo, o que resulta normalmente em características de uma cerveja clara, com pequenas variações de coloração a depender da variedade de malte utilizado. Por outro lado, as cervejas *Ale* são processadas em temperaturas mais altas, resultando em cervejas com maior teor alcoólico e propriedades de aroma, sabor e corpo mais acentuados (VELLOSO, 2020).

### 4.3. Processamento

Após escolher o estilo de cerveja que será produzido, bem como a receita, as matérias-primas e possíveis aditivos, inicia-se a produção, que consiste em diversas etapas que passam desde o preparo dos ingredientes até a embalagem.

Na etapa da maltagem, os grãos utilizados como fonte de amido são preparados. São colocados de molho por cerca de 40 horas, sofrem um repouso de 5 dias e depois são secos, em processo de exposição a altas temperaturas em forno

de forma gradual. Finalizado o processo de secagem, os grãos são denominados malte (CARVALHO, 2007).

Na segunda etapa começa a mostura, que consiste na extração e hidrólise dos componentes do malte e solubilização dos carboidratos - açúcares do malte - sob temperatura e tempos controlados, além de constante agitação. A solução de mosto composta por água potável e malte contém: proteínas, aminoácidos, sais minerais e carboidratos, os quais são disponibilizados a partir de enzimas contidas no próprio malte. A degradação dos amidos ocorre em três etapas: (I) gelatinização, (II) liquefação e (III) sacarificação.

Na primeira, as moléculas de amido são quebradas de forma repentina, sendo convertidas de forma facilitada pelas enzimas do tipo amilase; Posteriormente, na liquefação, ocorre a absorção de água pelo amido, e esse processo é conduzido enzimaticamente pela  $\alpha$ -amilase; em seguida, durante a etapa de sacarificação, ocorre a formação dos açúcares que serão utilizados na fermentação (ABOUMRAD; BARCELLOS, 2016; BRIGGS *et al*, 2004; SCHUINA, 2018). Ao final da mostura, o mosto - líquido açucarado extraído na sacarificação - é drenado - o mosto é separado da casca e do material não solubilizado - e levado à fervura (CARVALHO, 2007).

Na etapa da fervura, o mosto é levado à ebulição e sofre esterilização, que inativa microrganismos contaminantes, como bactérias e leveduras selvagens. Além disso, as enzimas amilases e proteases ainda presentes também são inativadas, por coagulação das proteínas, que são precipitadas em flocos. Ocorre também a evaporação da água - que reduz o volume inicial do mosto - e dos compostos voláteis indesejáveis, que são então removidos (BRIGGS *et al*, 2004; SCHUINA, 2018).

Na etapa da fervura o lúpulo é adicionado, e nesse processo de adição primária ocorre o aumento do amargor, por intermédio da isomerização dos  $\alpha$ -ácidos contidos nos lúpulos (ABOUMRAD; BARCELLOS, 2016; CARVALHO, 2007; SCHUINA, 2018). Por conseguinte, de acordo com JUNIOR, VIEIRA e FERREIRA (2009):

Muitas vezes, o lúpulo é acrescentado quando a fervura está no meio ou mesmo no final, outras vezes pode ser adicionado em parcelas durante o processamento. A razão é que os óleos essenciais

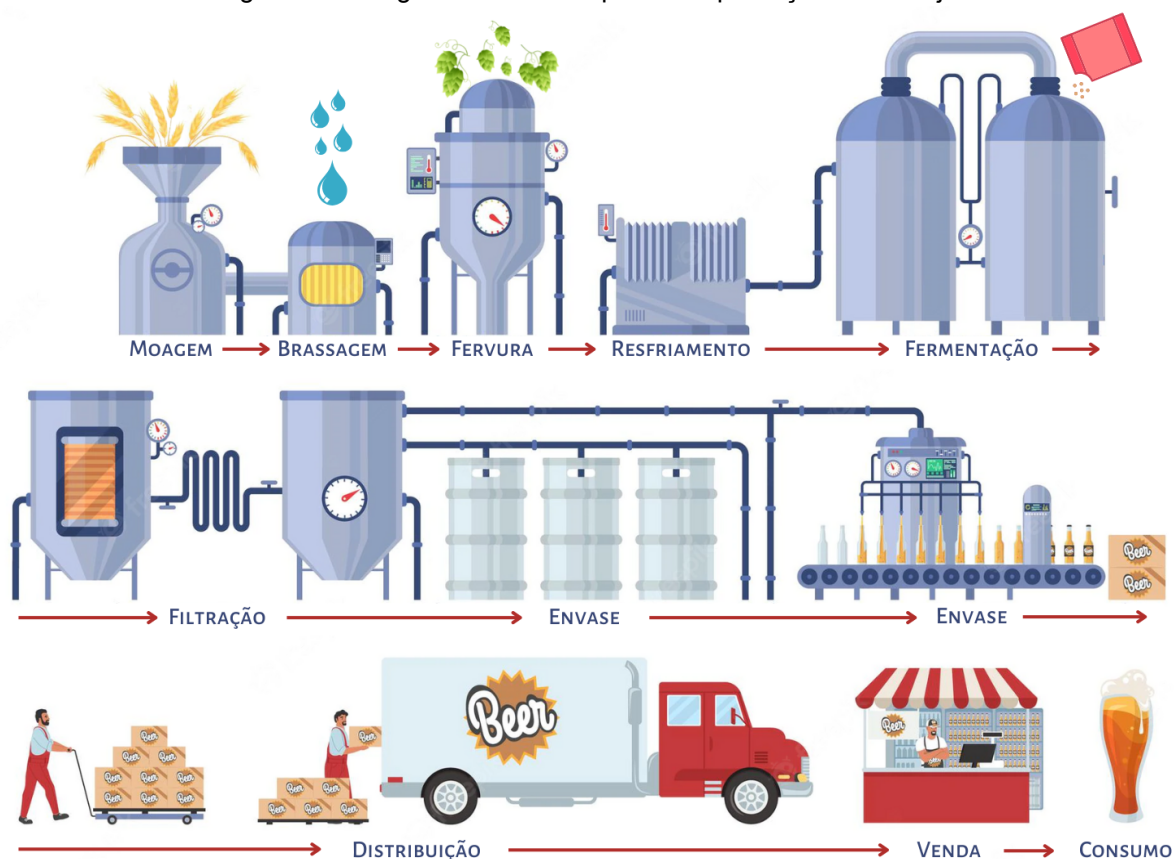
responsáveis pelo desenvolvimento do aroma são voláteis, podendo perder-se na fervura (JUNIOR; VIEIRA; FERREIRA, 2009).

Ao final da fervura o mosto passa por resfriamento enquanto é agitado para que o *trub* (material mucilaginoso formado a partir da junção das proteínas do malte, com os taninos, que são polifenóis do malte e do lúpulo e outras partículas que podem estar presentes no mosto) seja decantado e separado, e o mosto alcance rapidamente a temperatura ideal para inoculação da levedura (SCHUINA, 2018).

Inoculada a levedura, inicia-se o processo de fermentação. Por se tratar de um microrganismo anaeróbio facultativo, a presença do oxigênio dissolvido no mosto facilitará o processo de adaptação da levedura ao meio, promovendo o crescimento celular com formação de CO<sub>2</sub> e água. Esgotado o oxigênio, em ambiente de anaerobiose tem início o processo de fermentação alcoólica a partir da glicose e de outros açúcares presentes no mosto (BRIGGS *et al*, 2004; SCHUINA, 2018).

Na etapa seguinte, chamada maturação, a levedura acumulada é separada da cerveja, que é resfriada para passar por alterações referentes à redução do nível de outros compostos indesejáveis, como acetaldeídos e compostos de enxofre, além de ser possível adicionar substâncias voltadas aos ajustes de cor, amargor e sabor (CARVALHO, 2007; SCHUINA, 2018). A figura I ilustra um fluxograma básico dos processos descritos acima.

Figura I - Fluxograma básico do processo produção de cerveja



FONTE: Adaptado de *Freepik*.

#### 4.4. Parâmetros físico-químicos

##### Amargor

O amargor de uma cerveja é uma característica sensorial de notável significância na qualidade do produto final disponível para o consumo, e por consequência, impacta na percepção dos consumidores de forma fácil e primária (HUNTER; DOMPKOWSKI, 2018).

A característica amarga da cerveja provém principalmente da isomerização de ácidos amargos chamados de  $\alpha$ -ácidos, que estão presentes nas glândulas de lupulina (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). Os  $\alpha$ -ácidos são compostos pelos humulona, cohumulona, e adhumulona, enquanto sua forma isomerizada, os iso- $\alpha$ -ácidos, têm como seus correspondentes a iso-humulona, iso-co-humulona, e iso-ad-humulona (KISHIMOTO et al., 2022; SILVA; FARIA, 2008)

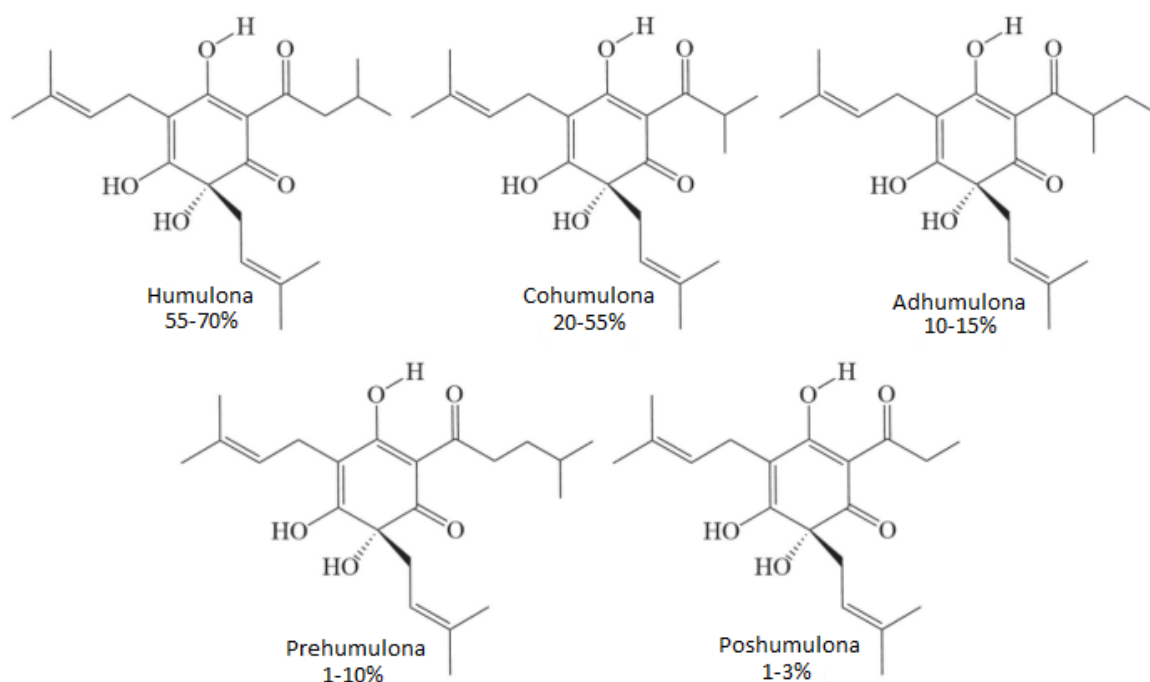
Na produção cervejeira, os lúpulos de amargor são adicionados - prioritariamente os que apresentam mais de 10% de  $\alpha$ -ácidos - no início da etapa de

fervura do mosto, que dura de 45 a 60 minutos. Nessa etapa, os  $\alpha$ -ácidos passam pelo processo de isomerização, que é favorecida por altas temperaturas e originam os iso- $\alpha$ -ácidos, mais amargos e mais solúveis em água que as humulonas (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019; KISHIMOTO et al., 2022; SILVA; FARIA, 2008). Assim, segundo DURELLO, SILVA e BOGUSZ (2019):

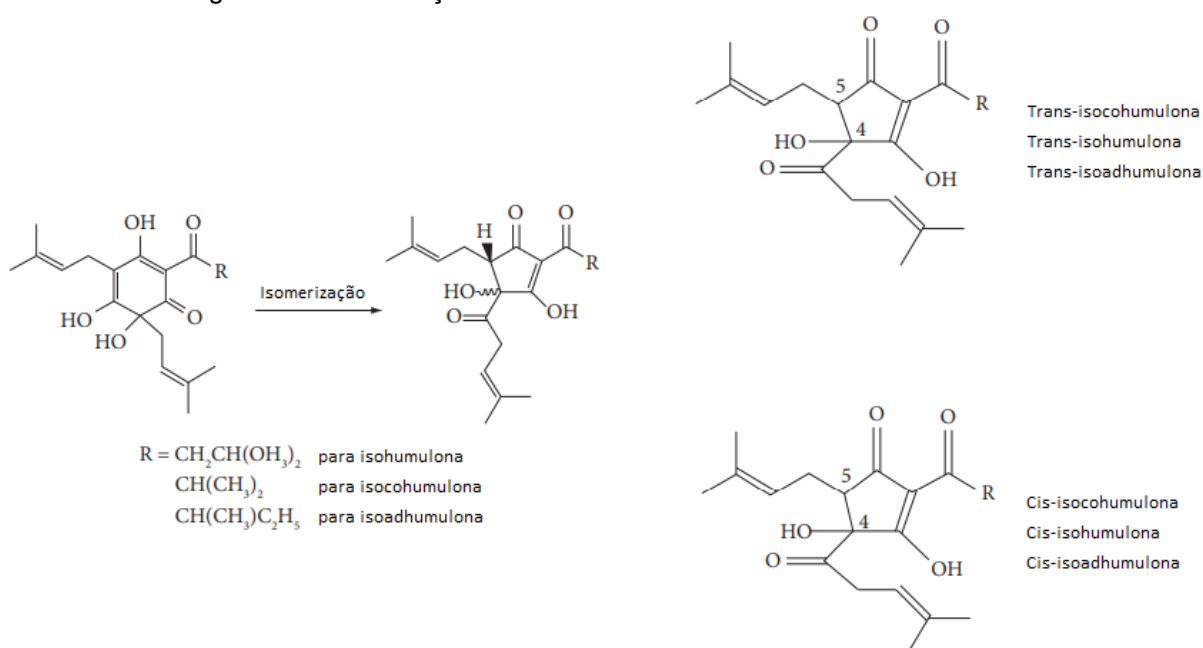
A isomerização é uma reação favorecida em temperaturas elevadas ( $\geq 100$  °C) e, durante este processo, cada humulona gera seus dois diastereoisômeros na forma cis-iso-humulona e trans-iso-humulona. De modo que as cinco humulonas presentes nos lúpulo vão dar origem a um total de dez diastereoisômeros, sendo cinco destes na configuração cis e cinco na configuração trans. Na cerveja, as cis-iso-humulonas são consideradas como as principais moléculas responsáveis pelo gosto amargo da bebida, sendo mais amargas que as trans-iso-humulonas (DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

As figuras abaixo representam, respectivamente (II) as estruturas químicas das principais humulonas do lúpulo, e (III) a representação da reação de isomerização.

Figura II - Estruturas químicas das principais humulonas do lúpulo



FONTE: Adaptado de DURELLO, SILVA e BOGUSZ, 2019.

Figura III - Isomerização de  $\alpha$ -ácidos em iso- $\alpha$ -ácidos e seus derivados

FONTE: Adaptado de SILVA; FARIA, 2008.

A concentração responsável por gerar o teor de amargos é expressa em Unidades Internacionais de Amargor (do inglês *International Bitterness Units*, IBU), na qual 1 IBU é equivalente a 1 mg de iso- $\alpha$ -ácidos  $\text{L}^{-1}$  (HUNTER; DOMPKOWSKI, 2018).

O método considerado padrão e oficial pela *European Brewery Convention* (EBC) e a *American Society of Brewing Chemists* (ASBC) para fins de estimar o teor de amargos nas cervejas utiliza técnicas espectrofotométricas para a medida dos iso- $\alpha$ -ácidos totais após extração por solventes, e a concentração é então expressa em *Bitterness Units* (BU) (KISHIMOTO *et al.*, 2022).

Portanto, partindo da significância do impacto dos iso- $\alpha$ -ácidos no sabor amargo característico da cerveja, faz-se presente a importância de conhecer e quantificar esses compostos, estimando assim o quanto de amargor é colocado na cerveja. Porém, apenas com essa estimativa não é possível afirmar com eficiência o amargor pretendido, e nesse cenário destaca-se a relevância do cálculo de IBU, com o objetivo de assegurar o teor amargo presente no produto final DURELLO, SILVA e BOGUSZ, 2019).

## Cor

Na indústria alimentícia a coloração é um dos parâmetros de qualidade mais importantes, e o mesmo ocorre na produção cervejeira. Apesar de não afetar diretamente o sabor, é um fator crítico na percepção de qualidade por parte dos consumidores, e além disso, é um indicativo da qualidade do processo produtivo e das matérias-primas (“Raise the Colors!”, [s.d.]

A coloração da cerveja é diretamente relacionada ao seu estilo, e é determinada por vários fatores, mas primariamente pela seleção dos grãos de malte, sua quantidade e variedade utilizadas, e mais especificamente pelo processo de torrefação pelo qual os grãos passaram; o malte normalmente confere uma cor “pálida” à cerveja, referente ao estilo clássico “pale ale”, assim, com o objetivo de obter uma coloração mais escura, é necessário adicionar maltes de característica mais torrada e/ou caramelizada. (CARO *et al.*, 2019).

Dessa forma, é possível prever a coloração final da cerveja pelo cálculo correspondente à contribuição de cada variedade de malte, extrato de malte e possíveis aditivos utilizados, e a produção cervejeira possibilita que quem produz consiga executar suas próprias receitas de acordo com o estilo e os parâmetros físicos e sensoriais que almejam obter (CARO *et al.*, 2019). Então, ao final do processo, necessitam checar se as propriedades do produto final condizem com a ideia inicial de receita e com o processo produtivo realizado.

Conforme citado, dentre os vários ingredientes possíveis a serem utilizados na produção cervejeira, a coloração é influenciada de forma primária pelo processamento do malte. A cevada em si contém concentrações baixas de substâncias pigmentadas, e é o processo de torrefação que resulta na formação da cor. As fases de germinação e secagem são as etapas primárias que posteriormente vão determinar a extensão da formação de cor a partir das reações de escurecimento de Maillard, e em alguns casos, reações de caramelização e pirólise (KOREN *et al.*, 2020; SHELLHAMMER, 2009).

As reações de Maillard são fundamentais para a cor da cerveja, têm início no endosperma da cevada durante a maltagem e podem recomeçar durante a fervura do mosto. Os dois componentes principais desta reação são os açúcares redutores -

principalmente a maltose - e aminoácidos livres ou grupos amino de aminoácidos que compreendem proteínas (KOREN *et al.*, 2020; SHELLHAMMER, 2009).

Além dessas reações acionadas por calor, a segunda influência na coloração diz respeito à oxidação de polifenóis derivados do lúpulo e da casca da cevada durante o armazenamento/envelhecimento da cerveja, que leva a uma interação proteína-polifenol aprimorada que gera um grau de turbidez; a dispersão da luz através desta neblina afeta a medição da cor e sua percepção pelos consumidores (KOREN *et al.*, 2020). A Tabela I trata de alguns aspectos referentes a diferentes variedades de malte de cevada:

Tabela I - Aparência e sabor de maltes de cevada

Tipo	Cor (SRM)	Aparência	Estilo da cerveja	Sabor
<b>Maltes padrão</b>				
Wheat	1	Amarelo palha	Weizen	Maltado
Pale larger	2	Amarelo pálido	Lagers claras	Cereal
Pale ale	3	Amarelo ouro	Ales	Biscoito, tostado
Vienna	4	Âmbar	Lagers escuras	Nozes carameladas
<b>Maltes de cor/caramelizados</b>				
Munich	10-20	Âmbar, marrom	Amber beer	Maltado intenso
Cara pils	5-15	Pálida	Lagers	Doce, biscoito
Caramel/Crystal	20-120	Âmbar, marrom, vermelha	Ales e lagers	Caramelo, nozes, tostado
<b>Maltes torrados</b>				
Chocolate	350	Marrom, preto	Porters e stouts	Café
Black	400-600	Preto	Porters e stouts	Neutro
Roasted barley	300-800	Preto	Irish stout	Amargo, queimado

FONTE: Adaptado de SHELLHAMMER, 2009.

Historicamente, a cor da cerveja era classificada em graus Lovibond (°L). Este sistema foi criado em 1883 por J. W. Lovibond e consistia em lâminas de vidro de

diferentes tonalidades que poderiam ser combinadas para produzir uma gama de cores. Um padrão de amostra de cerveja ou mosto era comparado a combinações dessas lâminas para determinar a classificação. No entanto, essa técnica sofria de inconsistências no resultado devido ao desbotamento da cor devido ao tempo de exposição, rotulagem incorreta, influência das condições de iluminação, quantidade de amostra utilizada e erro humano (“Raise the Colors!”, [s.d.]; SHELLHAMMER, 2009).

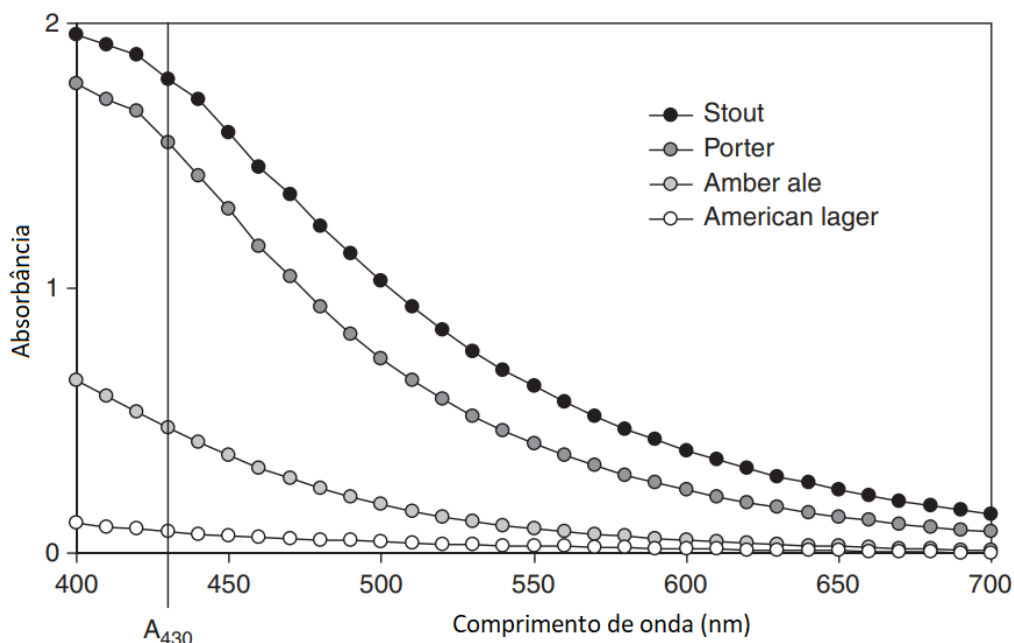
Com os avanços tecnológicos e produtivos referentes ao processamento cervejeiro, o método espectrofotométrico de análise de cor surgiu e tornou-se padrão por convenções europeias e americanas de cervejaria até os dias atuais, com a grande vantagem de se tratar de um método independente das condições de iluminação local que alteram a percepção da cor (CARO *et al.*, 2019). O método consiste na medição da absorvância da amostra testada no comprimento de onda de 430 nm em cubeta de 10 mm, e a cor obtida é expressa em unidades EBC (*European Brewing Convention*) ou em SRM (*Standard Reference Method*), seguindo as fórmulas:

$$\text{Cor EBC} = 25 \cdot A \cdot f$$

$$\text{Cor SRM} = 12.7 \cdot A \cdot f$$

Onde  $f$  é o fator de diluição utilizado para obter o valor de absorvância na linearidade do espectrofotômetro. Além da diluição, o procedimento requer a descarbonatação da amostra, que consiste em remover - por técnicas padrões manuais ou automáticas de agitação ou filtração - o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) contido, que por conta das bolhas formadas pode alterar a confiabilidade do resultado (CARO *et al.*, 2019). A figura IV representa o espectro de absorvância da cor de diferentes estilos de cerveja.

Figura IV - Espectro de absorvância de quatro diferentes estilos de cerveja



FONTE: Adaptado de SHELLHAMMER, 2009.

### Dicetonas vicinais

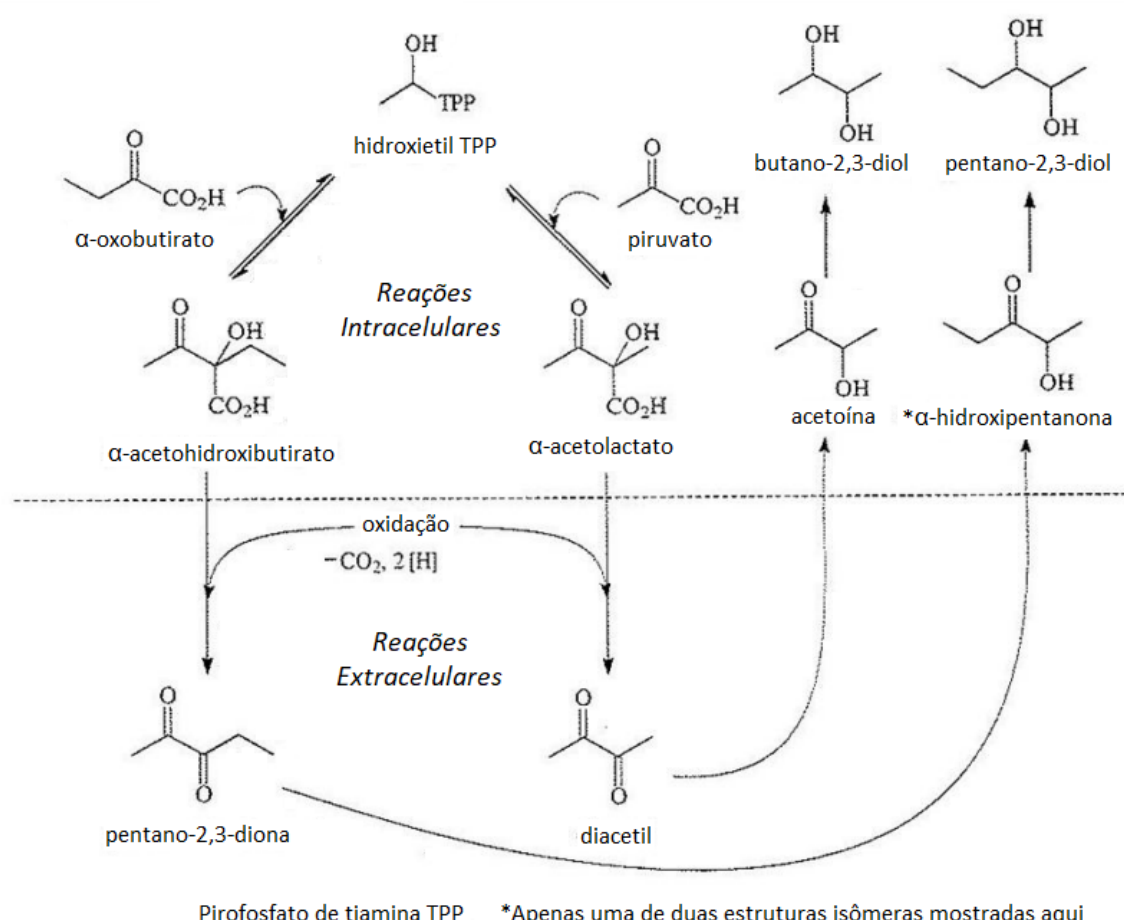
Além de ser responsável pela produção de álcool durante o processo fermentativo da cerveja, as leveduras dão origem a alguns compostos aromáticos e de sabor (MARAIS, 2010). Um desses aromáticos é o diacetil (2,3-Butanodiona), altamente indesejável no resultado final da bebida, e seus sabores característicos incluem manteiga rançosa e caramelo (BRESSIANI, 2022).

Durante a fermentação, ocorre um acúmulo de diacetil resultante da biossíntese de aminoácidos, e tanto a produção como a redução de diacetil são relatadas como associadas à atividade da levedura, sendo a redução o fator limitante do tempo de fermentação, pois precisa ser reduzida abaixo de 100 ppb, antes de iniciar a maturação (ANDERSON *et al.*, 2019).

As dicetonas vicinais são moléculas com dois grupos cetona em átomos de carbono adjacente (vicinais). As mais comuns encontradas na cerveja são 2,3-butanodiona - também chamada de diacetil - e 2,3-pentanodiona - que gera notas indesejáveis de sabor de mel -, responsáveis por características indesejáveis chamadas de *off-flavours*, associadas também com processos de deterioração (ANDERSON *et al.*, 2019; BRESSIANI, 2022).

Produzidas no processo fermentativo, as dicetonas são formadas por uma reação de cadeia longa. Durante a síntese de valina e isoleucina, os precursores  $\alpha$ -acetolactato e  $\alpha$ -acetohidroxibutirato são excretados pelas células da levedura e sofrem descarboxilação oxidativa para formar diacetil e pentanodiona, respectivamente, como apresentado na figura V (ANDERSON *et al.*, 2019).

Figura V - Esquema demonstrativo do processo bioquímico de formação e redução das dicetonas vicinais



FONTE: Adaptado de MARAIS, 2010.

Além de produzir *off-flavours*, uma proporção de dicetonas vicinais reflete o grau de contaminação microbiana na cerveja. A concentração em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de pentanodiona foi reduzida em amostras que foram contaminadas por microrganismos durante a fermentação, e foi observado um aumento considerável de diacetil ao mesmo tempo (TIAN, 2010).

Portanto, foi determinado que uma razão de aproximadamente 1 representava um cerveja "normal" enquanto cervejas contaminadas tiveram uma proporção maior

que um. Como esses dois compostos são usados como analitos-alvo para controlar a qualidade da cerveja, sua quantificação é importante para a indústria cervejeira (ANDERSON *et al.*, 2019; TIAN, 2010).

### **Compostos fenólicos**

A estabilidade do sabor e a estabilidade coloidal da cerveja são dois indicadores importantes de qualidade, e estão interligadas, já que a estabilidade coloidal implica na remoção de polifenóis, os quais são significativos na estabilidade do sabor. Polifenóis presentes na composição química do lúpulo e do malte caracterizam o sabor amargo mais pronunciado e presente no paladar na degustação de alguns estilos de cerveja de alta fermentação, como a *Indian Pale Ale*; por outro lado, em outros tipos como as cervejas *lagers*, de baixa fermentação, a presença dessa característica é indesejada (HABSCHIED *et al.*, 2021).

Além da influência no paladar, outros parâmetros influenciados pelos polifenóis dizem respeito à proteção contra oxidação e adstringência e melhoria de propriedades físico-químicas referentes ao corpo da bebida (BAMFORTH, 2000; HABSCHIED *et al.*, 2021). Sobre os polifenóis é possível afirmar:

Esses compostos fenólicos possuem reconhecida função antioxidante, ao atuarem como doadores de prótons, neutralizando radicais livres, com a produção de compostos estáveis, interrompendo assim a cascata de propagação dos radicais livres. Outros antioxidantes atuam impedindo a decomposição de peróxidos e hidroperóxidos, transformando-os em uma forma inativa. Além disso, algumas espécies podem quelar metais de transição, impedindo que ocorra reações redoxes e evitando os processos de oxidação (BUENO *et al.*, 2021).

Compostos fenólicos na cerveja são originados principalmente do malte (70%), em consequência dos processos de maltagem e moagem, e do lúpulo (30%) - polifenóis são metabólitos secundários de plantas e desempenham um papel importante como agentes protetores -, ou são formados a partir de transformações químicas na produção cervejeira (HABSCHIED *et al.*, 2021).

Ocorrem ácidos fenólicos, flavonóides de três tipos: Flavanóis (catequinas e epicatequinas); Antocianinas - pelargonidina, malvidina, leucocianidinas e leucopelargonidina - e seus produtos derivados de oxidação (como as chalconas); e os Flavonóis (quercitina, kampferol, mircetina). Também ocorrem compostos

fenólicos mais complexos, os taninos, sendo os mais importantes as proantocianidinas, de diversos graus de polimerização (DE FREITAS, 2006).

Moléculas polifenólicas são encontrados em diferentes estágios do processo produtivo e reagem com proteínas: durante a fervura, polifenóis e proteínas se aglutinam formando uma espuma conhecida como *hot break*; enquanto a fervura avança, a espuma se reintegra ao mosto, e decanta na etapa de resfriamento, formando o *cold break*. Além disso, após a fermentação, polifenóis e proteínas estão envolvidos na formação de turbidez, facilitando a remoção de compostos indesejáveis com a filtração. Por outro lado, também tendem a formar uma turbidez indesejada ao reagir na bebida mesmo após embalada, interferindo no tempo de prateleira (BAMFORTH, 2000; “O Impacto ao Remover a Espuma da Fervura – The Impact Of Removing Hot Break During The Boil – HOMEBREWXP”, [s.d.]).

A atividade antioxidante e o teor de polifenóis da cerveja, associados ao seu baixo teor alcóolico são fatores relevantes na avaliação da qualidade nutricional da cerveja. Estudos epidemiológicos sugeriram associações entre o consumo a longo prazo de alimentos ricos em polifenóis e a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, diabetes, inflamação e doenças degenerativas (HABSCHIED; LONČARIĆ; MASTANJEVIĆ, 2020).

Recentemente, foi relatado que a adição de frutas durante o processo de fermentação aumenta significativamente o teor de compostos bioativos e a atividade antioxidante da cerveja (NARDINI; FODDAI, 2020). Dessa forma, seu consumo moderado aumenta as atividades antioxidantes e anticoagulantes do plasma, afeta positivamente os níveis de lipídios plasmáticos e exerce efeitos protetores sobre o risco cardiovascular (NARDINI; FODDAI, 2020).

Os métodos internacionais padronizados para análise do teor de polifenóis totais são da ASBC (*Beer 35 – Total polyphenols*), no qual utiliza-se um meio reativo com citrato férrico em solução alcalina, produzindo uma coloração vermelha que é medida em espectrofotômetro, e o método da Analytica EBC (*section 9, method 9.11 – Total polyphenols in beer by spectrophotometry*) que estabelece a concentração de polifenóis totais em  $\text{mg/L}^{-1}$ , utilizando espectrofotometria no comprimento de onda de 600 nm.

#### **4.5. Controle de qualidade e POPs**

A fim de assegurar que a produção e os ensaios feitos em uma cervejaria, ou em laboratório cervejeiro, sejam executados de forma controlada e padronizada, cumprindo com as especificações pré-estabelecidas, faz-se necessário deliberar o conjunto de atividades necessárias aos profissionais que definem o controle de qualidade. A preferência do consumidor é um dos critérios da boa qualidade, já que o produto ou serviço oferecido precisa atender as necessidades do cliente de forma segura e confiável, e para isso, controla-se o processo através dos seus efeitos (GRADIM, 2015).

Dessa forma, os índices de controle em um processo são parâmetros numéricos que se estabelecem sobre os efeitos. As atividades relativas ao controle envolvem todas as decisões que estão relacionadas à qualidade final do produto ou serviço que é oferecido, incluindo gestão, produção e especificidades como laboratório físico-químico, por exemplo (BOKULICH; BAMFORTH, 2013).

No caso da cerveja artesanal, pensar em um produto final de boa qualidade - consistência em aroma, sabor e aparência - é também pensar na boa prática e no processo, levando em consideração que microcervejarias - cervejarias com menor porte de funcionários, equipamentos e produção - têm desafios diferentes se comparadas à empresas multinacionais (BAMFORTH, 2016).

Mas, de forma geral, pode-se dizer que uma produção cervejeira de alta qualidade conta com consistência na produção do mosto, qualidade de matérias-primas e cuidado relacionado às etapas de fermentação, maturação e outras necessárias à finalização (BAMFORTH, 2016; ESSLINGER, [s.d.]).

Nesse sentido, o chamado escopo do controle de qualidade de cada cervejaria pode variar, como um conjunto de atividades repassadas aos profissionais envolvidos, com poucos detalhes documentados, ou então uma série de manuais e procedimentos referentes às atividades produtivas (GRADIM, 2015).

Para fins de organização, faz sentido a utilização de um Sistema de Gestão da Qualidade, o qual indica que as atividades são desenvolvidas com o objetivo de satisfazer critérios bem definidos e pode contar com certificações de acordo com

padrões de qualidade da série ISO 9000 - que aborda vários aspectos e fornece orientações para uma qualidade aprimorada de forma consistente - e boas práticas de fabricação (GRADIM, 2015).

Características como extrato, alcoometria, cor, amargos, turbidez e pH são alguns exemplos de parâmetros de qualidade comuns em cervejarias (BOKULICH; BAMFORTH, 2013). No Brasil, o padrão adotado pelo MAPA utiliza como base o método *The European Brewery Convention* (EBC - União Européia), mas além deste, há uma variedade de padrões relacionados aos métodos analíticos reconhecidos internacionalmente, são os principais:

- *The Institute of Brewing and Distilling* (IBD - Reino Unido);
- *The American Society of Brewing Chemists* (ASBC - EUA);
- *The Methodensammlung der Mitteleuropäischen Brautechnischen Analysen Kommission* (MEBAK - Alemanha).

Mediante as dificuldades encontradas no processo produtivo de uma microcervejaria, ou em um laboratório de análise de cervejas, uma das formas de auxiliar a realização dos métodos analíticos de forma correta e padronizada se refere aos Procedimentos Operacionais Padrão (POP), definidos pela Anvisa, de acordo com a Resolução RDC nº 275 de 2002 como:

Procedimento escrito de forma objetiva que estabelece instruções sequenciais para a realização de operações rotineiras e específicas na produção, armazenamento e transporte de alimentos (BRASIL, 2002).

Um Procedimento Operacional Padrão (POP), tem como função apresentar instruções de ordem das operações e sua frequência de execução. Ou seja, descrever as tarefas que fazem parte da rotina de trabalho, de forma simples, objetiva e completa. O mapeamento dos processos e sua documentação, possibilitam que os funcionários de uma organização entendam o seu funcionamento de forma geral e as atividades que cada setor desempenha (BEERSALES, 2019).

Portanto, a partir do exposto, é possível compreender a relevância de um controle que permita identificar os fatores que precisam ser monitorados, medidos e controlados no processo de fabricação cervejeiro. Enfatizar o controle com o auxílio dos POPs durante e pós processamento é assegurar a identificação, redução e/ou eliminação das fontes de variação (BEERSALES, 2019).

## 5. METODOLOGIA

O presente projeto retrata, do panorama da natureza das pesquisas, a Pesquisa Aplicada que busca como objetivo gerar conhecimento que terá aplicação prática e experimental, entendida à solução do problema de interesse local acerca da padronização de processos e análises feitas em laboratório (KAUARK *et al.*, 2010).

A forma de abordagem do problema será uma Pesquisa Quantitativa, pois terá como base protocolos de análise já estabelecidos, portanto, trata-se de um evento mensurável e especificado, que pode se tornar objetivo por meio da observação sistemática (KAUARK *et al.*, 2010).

Da perspectiva dos objetivos há de ser uma Pesquisa Explicativa, que identifica os fatores determinantes para a ocorrência dos fenômenos referentes aos testes físico-químicos, por meio de método experimental. No sentido dos procedimentos técnicos a pesquisa terá caráter Bibliográfico com base nos protocolos e artigos já consolidados sobre a temática e também de Pesquisa Experimental, com a cerveja e o lúpulo como objetos do estudo (KAUARK *et al.*, 2010).

### 5.1 Planejamento experimental

A análise experimental foi feita de forma prática para os parâmetros de amargor cor. Para os parâmetros de dicetonas vicinais, polifenóis e flavonoides, os POPs foram confeccionados de acordo com as normas analíticas da Convenção Européia de Cerveja (EBC, 2010).

Para a análise de amargor e cor, as amostras de cerveja foram obtidas de cervejas compradas no supermercado Perim, no bairro Aribiri, na cidade de Vila Velha, sendo estas (respectivamente, estilo e fabricante): Pilsen - Baden Baden; India Pale Ale - Colorado; Red Amber Lager - Bruder; Porter - Ashby.

As análises foram feitas em triplicata de acordo com as normas analíticas da Convenção Européia de Cerveja (EBC, 2010). Após testagem e adequação, os Procedimentos Operacionais Padrão foram concluídos.

## 5.2 Análise de amargor (IBU)

Foi realizado conforme o método *Analytica EBC (section 9, method 9.8 – Bitterness of beer IM)*, que consiste em adicionar em 10 mL da amostra descarbonatada, 0,5 mL de solução de HCl 6 M, 20 mL de isooctano P.A e manter o sistema em agitação durante 15 minutos. A mistura também foi submetida à centrifugação por 3 minutos e 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado para leitura do extrato de isooctano a 275 nm, em espectrofotômetro (*Thermo Fisher Scientific Genesys 6*), utilizando como o branco o isooctano P.A. A escala IBU (*International Bitterness Unit*) foi utilizada para expressar o amargor da cerveja, a partir da equação  $IBU = A_{275} \times 50$  (ASBC, 2017; EBC, 2010; SCHUINA, 2018).

## 5.3 Análise de cor (EBC)

A análise da cor feita por leitura direta em espectrofotômetro foi realizada de acordo com a *Analytica EBC (section 9, method 9.6 - Color of beer: spectrophotometric method)*, na qual as amostras foram previamente filtradas através de um filtro de membrana. A absorbância da amostra foi medida em espectrofotômetro (*Thermo Fisher Scientific Genesys 6*) no comprimento de onda de 430 nm, contra a água destilada utilizada como branco, o resultado se deu em unidades EBC.

## 5.4 Confecção dos POPs

A confecção dos Procedimentos Operacionais Padrão para uso no LACEMP se deu partindo, primeiramente, da escolha das análises, de acordo com as prioridades necessárias à realidade do laboratório e das demandas atuais e futuras que fazem parte da rotina de análises. Foram escolhidas seguindo os critérios de análises que pudessem ser feitas em espectrofotômetro, mais requeridas por cervejeiros e que gerassem algum avanço também no âmbito da pesquisa dentro do laboratório.

Após a etapa de escolha, as normas analíticas a serem seguidas foram selecionadas, seguindo o acervo de normas da *Analytica EBC (European Brewery Convention)*, sendo elas: *Section 9, method 9.8 – Bitterness of beer IM*; *Section 9, method 9.6 – Color of beer: spectrophotometric method*; *Section 9, method 9.24.1 – Vicinal diketones in beer: spectrophotometric method*; *Section 9, method 9.11 – Total*

*polyphenols in beer by spectrophotometry e Section 9, method 9.12 - Flavanoids in beer by spectrophotometry.*

Posteriormente à seleção das normas analíticas, teve início a elaboração dos POPs, seguindo o modelo utilizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (LIMA, 2014). Tal modelo foi escolhido por conter todos os tópicos pretendidos ao uso no LACEMP, bem como uma estrutura esclarecedora e objetiva para melhor compreensão de quem for utilizá-lo. Os modelos produzidos constam no **Apêndice A** - Procedimentos Operacionais Padrão.

Na última etapa, esta experimental, foram testados em laboratório os procedimentos de análise de cor e de análise de amargor, seguindo os respectivos POPs produzidos, conforme descrito nos tópicos 5.2 e 5.3 da Metodologia do presente trabalho.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme citado na metodologia, as análises foram feitas de acordo com as normas da *Analytica EBC (European Brewery Convention)*, base dos POPs produzidos, que constam no Apêndice **Apêndice A** - Procedimentos Operacionais Padrão.

As figuras VI, VII e VIII representam respectivamente, as quatro cervejas utilizadas para as análises; o espectrofotômetro utilizado; e o aspecto macroscópico das amostras. Todas as figuras referem-se às amostras e equipamentos utilizados nas análises de amargor (IBU) e cor (EBC), descritas posteriormente, na continuação dos resultados e discussão.

Figura VI - Rótulos (frente e verso) das cervejas utilizadas - Amostras 1, 2, 3 e 4



FONTE: Autoria própria, 2022.

Apenas nos rótulos das cervejas 1, 3 e 4 continham informações do valor de IBU; No rótulo da cerveja 2 havia um QR code que direciona ao site do fabricante, no qual continha o valor de IBU; Nenhum dos rótulos apresentava o valor de EBC ou

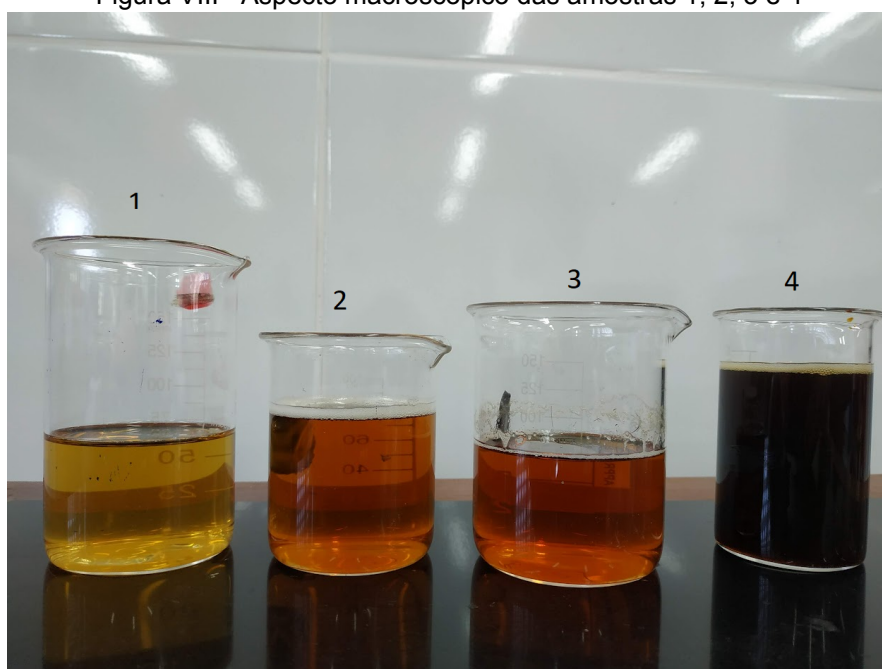
qualquer informação sobre cor. Os estilos, fabricantes e valores estão descritos na Tabela II, apresentada posteriormente.

Figura VII - Espectrofotômetro *Thermo Fisher Scientific Genesis 6*



FONTE: Autoria própria, 2022.

Figura VIII - Aspecto macroscópico das amostras 1, 2, 3 e 4



FONTE: Autoria própria, 2022.

### 6.1 Amargor (IBU)

A figura IX representa a etapa inicial de preparação de amostras, com a degaseificação das amostras sob agitação em baixa velocidade em agitador

magnético, durante 10 minutos. A amostra 4 foi desgaseificada após as três primeiras, pois no laboratório havia três agitadores magnéticos, por isso não consta na figura.

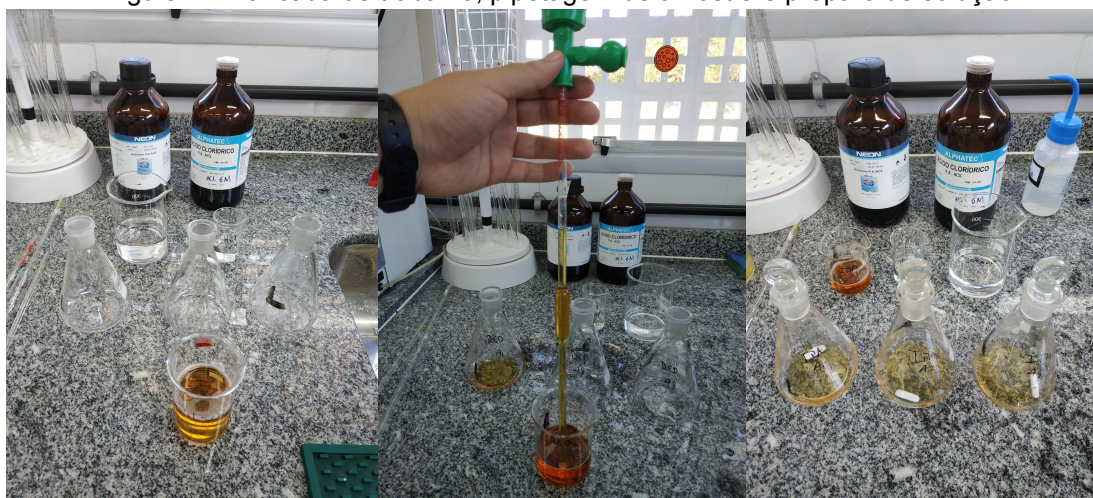
Figura IX - Etapa de desgaseificação - Amostras 1, 2 e 3



FONTE: Autoria própria, 2022.

Após a desgaseificação das amostras, as soluções para a extração do IBU foram preparadas em triplicata - pipetagem de 10 mL da amostra; 0,5 mL de HCl e 20 mL de isooctano no erlenmeyer -, a figura X ilustra essa etapa.

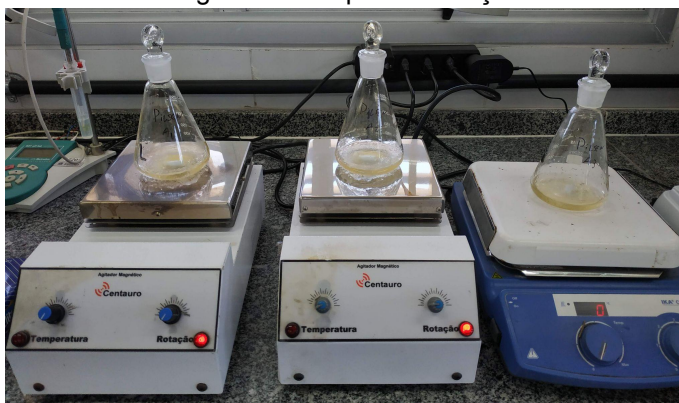
Figura X - Bancada de trabalho, pipetagem de amostra e preparo de solução



FONTE: Autoria própria, 2022.

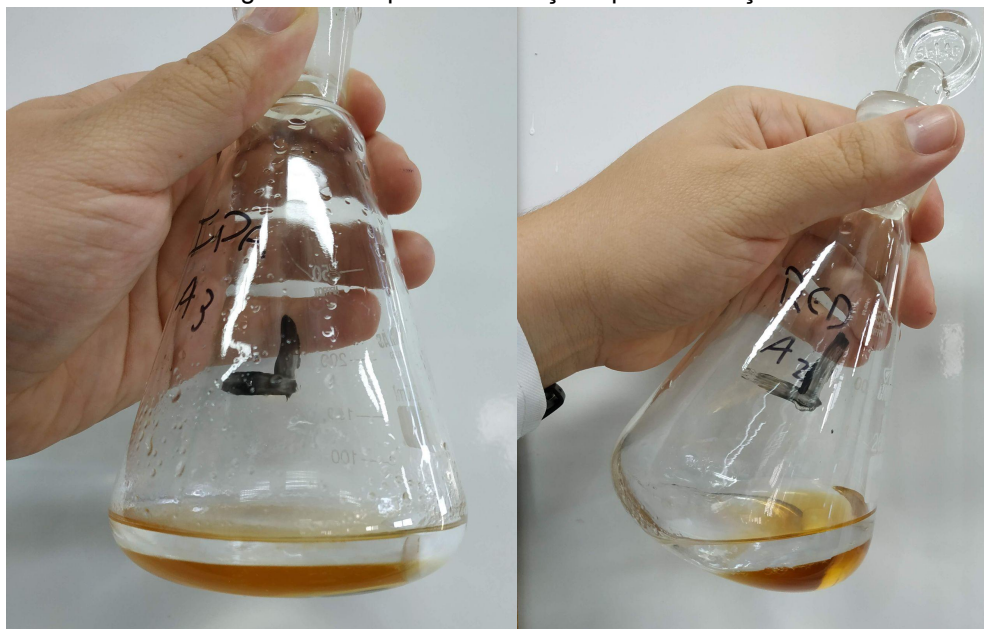
Os erlenmeyers com as soluções preparadas foram colocados sob agitador magnético por 15 minutos, assim ocorreu a extração do amargor e a separação das fases, conforme apresentado nas figuras abaixo.

Figura XI - Etapa de extração



FONTE: Autoria própria, 2022.

Figura XII - Aspecto da solução após a extração



FONTE: Autoria própria, 2022.

A fase sobrenadante das soluções (de aspecto macroscópico límpido) foi pipetada e utilizada para leitura em espectrofotômetro a 275 nm. O valor de IBU de cada amostra foi calculado seguindo a seguinte equação:

$$IBU = Absorbância \times 50$$

Os valores de absorbância obtidos, o valor final do cálculo de IBU e demais informações estão descritos na Tabela II.

Tabela II - Resultados da análise de amargor (IBU)

<b>Amargor (IBU)</b>				
	<b>Amostra 1</b>	<b>Amostra 2</b>	<b>Amostra 3</b>	<b>Amostra 4</b>
<b>Estilo</b> Fabricante	<b>Pilsen</b> Baden baden	<b>India Pale Ale (IPA)</b> Colorado	<b>Red Amber Lager</b> Brüder	<b>Porter</b> Ashby
Abs <sub>275</sub> 1	0,234	0,913	0,583	0,261
Abs <sub>275</sub> 2	0,187	0,858	0,606	0,304
Abs <sub>275</sub> 3	0,191	0,868	0,574	0,353
Abs <sub>275</sub> média	0,204	0,880	0,588	0,306
IBU	10,200	43,983	29,383	15,300
IBU rótulo	10	45	20	30

FONTE: Autoria própria, 2022.

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que as amostras 1 e 2 apresentaram valores de IBU muito próximos ao que consta em seus rótulos, portanto, valores coerentes para rotulagem e venda das cervejas.

Por outro lado, a amostra 3 apresentou valor de IBU superior ao que consta no rótulo, o que pode ter acontecido por: (I) alteração na receita sem mudança posterior de rótulo; (II) alterações não previstas em matéria-prima (lúpulo); (III) mudança de lote de algum ingrediente da receita; ou (IV) por próprio erro analítico manual durante a análise.

A amostra 4 apresentou valor de IBU inferior ao esperado de acordo com o rótulo, o que normalmente ocorre por alguma alteração no uso de matéria-prima (lúpulo), seja por menor quantidade utilizada na receita sem refazer a análise devida para a rotulagem ou por uso de matéria-prima que não esteja nas condições iniciais referentes ao valor esperado.

Nesse sentido, destaca-se a relevância de manter o controle de qualidade no uso das matérias-primas nas receitas cervejeiras, refazendo as análises de amargor com frequência e de forma padronizada, a fim de obter resultados que confirmem a coerência entre o que consta no rótulo do produto e o que a cerveja realmente entrega.

## 6.2 Cor (EBC)

Foram utilizadas as alíquotas das amostras 1, 2, 3 e 4 já desgaseificadas mediante o procedimento de análise anterior. As amostras foram lidas diretamente em espectrofotômetro a 430 nm, e o valor de EBC de cada amostra foi calculado seguindo a equação abaixo:

$$\text{Cor (EBC)} = A \times f \times 25$$

$A$  = absorvância a 430 nm em cubeta de 10 mm

$f$  = fator de diluição

As amostras 3 e 4, por terem coloração mais escura, precisaram ser diluídas (1:10) para uma leitura eficiente no espectrofotômetro e obtenção de resultado conivente com a realidade. O aspecto macroscópico da solução está apresentado na figura seguinte.

Figura XIII - Aspecto da diluição 1:10 das amostras 3 e 4



FONTE: Autoria própria, 2022.

Os valores de absorvância obtidos, o valor final do cálculo de EBC e demais informações estão descritos na Tabela III.

Tabela III - Resultados da análise de cor (EBC)

Cor (EBC)				
	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Estilo Fabricante	Pilsen Baden baden	India Pale Ale (IPA) Colorado	Red Amber Lager Brüder	Porter Ashby
Abs <sub>430</sub>	0,395	1,100	1,316	x
Abs <sub>430</sub> diluição 1:10	-	-	0,143	0,747
EBC	9,875	27,500	32,900	x
EBC diluição 1:10	-	-	35,750	186,750

FONTE: Autoria própria, 2022.

Conforme os dados apresentados na Tabela acima, e comparando o aspecto macroscópico das amostras (Figura VIII) com a escala utilizada como referência (Figura XIV), todas as amostras foram coerentes com relação ao valor de EBC obtido e a coloração vista no produto final - esperado para cada estilo de cerveja. Apenas algumas observações acerca das amostras 3 e 4 são feitas a seguir.

Tratando-se de uma cerveja do estilo Red Amber Lager, apesar da coloração avermelhada escura, ultrapassando o tom cobre, a amostra 3 foi lida pelo espectrofotômetro, mas passou por diluição para fins de comparação dos valores de EBC obtidos, que foram bem próximos e dentro da mesma categoria “cobre escuro” na escala (Figura XIV).

Por se tratar de uma cerveja do estilo Porter, de coloração extra escura - alcançando o preto -, a amostra 4 sem diluição não foi lida pelo espectrofotômetro, já com a diluição 1:10 a leitura foi feita. O valor de EBC obtido, se comparado a escala de cores (Figura XIV) ultrapassa significativamente o valor máximo de 79, referente a cor “negro opaco”. Essa não é uma situação incomum nas leituras de cervejas extremamente escuras em espectrofotômetro - mesmo que diluídas -, e nesses casos, conclui-se pela cor mais escura possível na escala de comparação.

Figura XIV - Escala de cores de cervejas

SRM	2-3	3-4	5-6	6-9	10-14	17-18	19-22	22-30	30-35	30+	40+
EBC	4-6	4-8	10-12	12-18	20-28	33-36	37-43	43-59	59-69	69	79
COR	Palha	Amarelo	Ouro	Âmbar profundo, cobre	Cobre	Cobre escuro	Marrom	Marrom escuro	Marrom muito escuro	Negro	Negro opaco

FONTE: MAFRA, 2018.

### 6.3 Elaboração dos POPs

Para elaborar os POPs de forma eficiente, objetiva e adequada à realidade e às necessidades do LACEMP, foi importante escolher análises mais requeridas por cervejeiros e que gerassem algum avanço também no âmbito da pesquisa dentro do laboratório.

Para a elaboração escrita, o modelo utilizado no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa (LIMA, 2014) sofreu algumas alterações mediante aos procedimentos técnicos específicos das normas da *Analytica EBC (European Brewery Convention)*, sendo elas: *Section 9, method 9.8 – Bitterness of beer IM*; *Section 9, method 9.6 – Color of beer: spectrophotometric method*; *Section 9, method 9.24.1 – Vicinal diketones in beer: spectrophotometric method*; *Section 9, method 9.11 – Total polyphenols in beer by spectrophotometry* e *Section 9, method 9.12 - Flavanoids in beer by spectrophotometry*.

Na prática da análise de amargor (IBU) foi importante ressaltar a pipetagem apenas da parte límpida da extração, como ilustra a figura XII. Na análise de cor (EBC), foi importante perceber a necessidade da diluição para leitura coerente da amostra 4 em espectrofotômetro, como apresentado na figura XIII.

## **7. CONCLUSÃO**

Com o objetivo de elaborar a padronização de processos nas análises físico-químicas feitas pelo Laboratório de Análises de Cervejas e Matérias-Primas (LACEMP), em conviência ao que foi apresentado e discutido, é possível consumir que a testagem das análises e a elaboração de Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) adequados à realidade do laboratório se deu de forma satisfatória, assim, o os POPs foram executados e validados para o uso.

Ocorreram parâmetros analíticos dentro do espectro esperado para a cor (EBC), dois valores de amargor (IBU) discordantes com relação ao rótulo e a comprovação de que a técnica proposta no POP é passível de ser compreendida e realizada de forma coerente e eficiente.

Ademais, os resultados provenientes corroboram a padronização de processos e análises de cervejas no LACEMP, com os intuitos atuais e também futuros de tornar-se um laboratório de referência no estado do Espírito Santo, fortalecer a produção cervejeira local e contribuir para o aprimoramento das pesquisas, produtos e serviços oferecidos.

## REFERÊNCIAS

- ABOUMRAD, J. P. C.; BARCELLOS, Y. C. M. Análise e simulação das operações de mosturação e fermentação no processo de produção de cervejas. 2016.
- ANDERSON, H. E. *et al.* A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. **Analytica Chimica Acta**, v. 1085, p. 1–20, nov. 2019.
- ARAÚJO, G. S. **Elaboração de uma cerveja Ale utilizando melão de caroá [*Sicana odorifera (Vell.) Naudim*] como adjunto do malte**. Salvador, 2016. Disponível em <<http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/20139>>. Acesso em 1 jun 2022.
- ASBC (American Society of Brewing Chemists). **Analysis Methods for the Brewery Industry**. Spectroquant Prove. 2017.
- BAMFORTH, C. W. (ED.). **Brewing materials and processes: a practical approach to beer excellence**. Amsterdam: Elsevier, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016.
- BAMFORTH, C. W. Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology. **The Chemical Educator**, v. 5, n. 3, p. 102–112, jun. 2000.
- BEERSALES. **POP e a Gestão de Qualidade O Software do mercado cervejeiro**. **BeerSales**, 1 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.beersales.com.br/pop-e-a-gestao-de-qualidade/>>. Acesso em: 9 nov. 2022
- BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157–172, jun. 2013.
- BRASIL. DECRETO Nº 8.442, DE 29 DE ABRIL DE 2015. Brasília, 2015.
- BRASIL. LEI COMPLEMENTAR Nº 155 DE 27 DE OUTUBRO DE 2016. Brasília, 2016.
- BRASIL. LEI Nº 13.097, DE 19 DE JANEIRO DE 2015. Brasília, 2015.
- BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária RDC Nº 275. Brasília: D.O.U., 21 de outubro de 2002.
- BRESSIANI, D. T. **Diacetil na Cerveja: tudo sobre o off flavor que aporta sabor amanteigado**. Disponível em: <<https://cervejaemalte.com.br/blog/diacetil-na-cerveja/>>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing Science and Practice**. Flórida: CRC Press LLC and Woodhead Publishing Limited, 2004.
- BUENO, A. *et al.* Avaliação dos teores de fenólicos totais e do potencial antioxidante durante a produção de cerveja artesanal. v. 12, p. 116–128, 2 nov. 2021.
- CARO, D. D. *et al.* **A low-cost device for beer color measurement**. 2019 IEEE International Workshop on Metrology for Agriculture and Forestry (MetroAgriFor). **Anais...** Em: 2019 IEEE INTERNATIONAL WORKSHOP ON METROLOGY FOR AGRICULTURE AND FORESTRY (METROAGRIFOR). out. 2019.

CARVALHO, L. G. Produção de cerveja. Rio de Janeiro: Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro, 2007. (Dossiê Técnico). Disponível em:<  
<http://www.sbrt.ibict.br/dossietecnico/downloadsDT/NTc=>>

DANENHOWER, T. M.; FORCE, L. J.; PETERSEN, K. J.; BETTS, T. A.; BAKER, G. A. **HPLC Analysis of [Alpha]- and [Beta]-Acids in Hops**. Journal of Chemical Education, v. 85, nº 7, p. 954-956. 2008.

DE FREITAS, G. L. Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum vulgare L.*) e no bagaço de brassagem. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Florianópolis, 2006.

DRAGONE, G; MUSSATTO, S. I.; SILVA, J. B. A. **Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade**. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 27(supl.): 37-40, ago. 2007. Disponível em <<https://www.scielo.br/j/cta/a/SvCtQMKcsDpjnCgVmmjzt3h/?lang=pt&format=pdf>>. Acesso em 22 mai. 2022.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ, S. QUÍMICA DO LÚPULO. **Química Nova**, v. 42, p. 900–919, 21 out. 2019.

DUTRA, V. L. M. Descrição de cervejas tipo Pilsen por métodos sensoriais rápidos e análises físico-químicas. 30 jul. 2019.

EBC. Analytica-EBC. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2010.

ESSLINGER, H. M. Handbook of Brewing. p. 779, [s.d.].

FISPAL Tecnologia Digital. **Indústria da Cerveja Artesanal**. Disponível em <<https://www.foodconnection.com.br/sites/foodconnection.com/files/ebook-guia%20cerveja%20artesanal.pdf>>. Acesso em 22 mai. 2022.

Freepik. Infográfico de vetor do processo de produção de cerveja. Linha de produção de cerveja, distribuição. Disponível em <[https://br.freepik.com/vetores-premium/infografico-de-vetor-do-processo-de-producao-de-veja-linha-de-producao-de-cerveja-de-cervejaria-distribuicao-venda-industria-cervejeira\\_22041981.htm](https://br.freepik.com/vetores-premium/infografico-de-vetor-do-processo-de-producao-de-veja-linha-de-producao-de-cerveja-de-cervejaria-distribuicao-venda-industria-cervejeira_22041981.htm)>. Acesso em 20 out. 2022.

FUNASA - Fundação Nacional de Saúde. Manual Prático de Análise de Água. 4ª ed. Brasília, 2013.

GRADIM, Artur João. Manual Boas Práticas de Fabricação - Indústrias de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes, “Versão comentada – Resolução RDC 48/13”. 2015

GUERREIRO, Lilian. **Produção de cerveja. Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas (SRBT)**. Rede de Tecnologia do Rio de Janeiro - REDETEC. 2007. Disponível em <<http://www.sbrt.ibict.br/dossie-tecnico/downloadsDT/NTc=>>>. Acesso em 22 mai. 2022.

HABSCHIED, K. *et al.* Beer Polyphenols—Bitterness, Astringency, and Off-Flavors. **Beverages**, v. 7, n. 2, p. 38, jun. 2021.

HABSCHIED, K.; LONČARIĆ, A.; MASTANJEVIĆ, K. Screening of Polyphenols and Antioxidative Activity in Industrial Beers. **Foods**, v. 9, n. 2, p. 238, fev. 2020.

HUNTER, R. A.; DOMPKOWSKI, E. J. Quantifying Beer Bitterness: An Investigation of the Impact of Sample Preparation. **Journal of Chemical Education**, v. 95, n. 11, p. 2009–2012, 13 nov. 2018.

JUNIOR, A. A. D.; VIEIRA, A. G.; FERREIRA, T. P. Processo de Produção de Cerveja. **Revista Processos Químicos**, v. 3, n. 6, p. 61–71, 1 jul. 2009.

KAUARK, F. S.; MANHÃES, F. C.; MEDEIROS, C. H. **Metodologia da Pesquisa: um guia prático**. Editora Itabuna: Bahia, 2010.

KEUKELEIRE, D. **Fundamentals of beer and hop chemistry**. Química Nova [online]. 2000, v. 23, n. 1.. Disponível em <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>>. Acesso em 22 mai. 2022.

KISHIMOTO, T. *et al.* Evaluation of Components Contributing to the International Bitterness Unit of Wort and Beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 80, n. 1, p. 53–61, 2 jan. 2022.

KOREN, D. *et al.* How to objectively determine the color of beer? **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 3, p. 1183–1189, mar. 2020.

MAFRA, G. P. **Análise físico-química de cerveja american lager maturada com pimenta rosa (aroeira)**. bachelorThesis—[s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 21 jun. 2018.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 72, DE 16 DE NOVEMBRO DE 2018. 2018.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Secretaria de Defesa Agropecuária. Anuário da Cerveja 2020. 2021.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Secretaria de Defesa Agropecuária. Anuário da Cerveja 2021. 2022.

MARAI, L. M. **The effect of yeast propagation temperature on diacetyl reduction – an in process study at Spendrups brewery**. 2010. 33 f. Master of sciences thesis (Master degree programme in Biotechnology) – Department of Biotechnology, Chalmers University of Technology, Göteborg, Sweden, 2010.

MS - Ministério da Saúde. PORTARIA GM/MS Nº 888, DE 4 DE MAIO DE 2021. Brasília, 2021.

NARDINI, M.; FODDAI, M. S. Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Special Beers. **Molecules**, v. 25, n. 11, p. 2466, jan. 2020.

**O Impacto ao Remover a Espuma da Fervura – The Impact Of Removing Hot Break During The Boil – HOMEBREWXP**. Disponível em: <<https://homebrewxp.wordpress.com/2019/05/23/espumafervura/>>. Acesso em: 5 nov. 2022.

**Raise the Colors!** Disponível em: <<https://byo.com/article/raise-the-colors/>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SCHUINA, G. L. **Utilização de plantas amargas em substituição ao lúpulo na produção de cerveja artesanal tipo American Lager**. São José do Rio Preto, 2018.

SHELLHAMMER, T. H. Beer color. Em: **Beer**. [s.l.] Elsevier, 2009. p. 213–227.

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. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 902–906, dez. 2008.

SINDICERV (Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja). Manual para o registro de estabelecimento cervejeiro junto ao MAPA, através do SIPEAGRO. Disponível em <<https://www.sindicerv.com.br/wp-content/uploads/2020/07/manual-de-registro-de-estabelecimento-sindicerv.pdf>>. Acesso em 2 nov. 2022.

STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; ANSTRUTHER, A. Handbook of brewing. Boca Raton: CRC Press,

TIAN, J. Determination of several flavours in beer with headspace sampling–gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 123, n. 4, p. 1318–1321, 15 dez. 2010.

TOZETTO, L. M. **Produção e Caracterização de Cerveja Artesanal Adicionada de Gengibre (*Zingiber officinale*)**. Ponta Grossa, 2017. Disponível em <[http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2451/1/PG\\_PPGE\\_M\\_Togetto%2C%20Luciano%20Moro\\_2017.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/2451/1/PG_PPGE_M_Togetto%2C%20Luciano%20Moro_2017.pdf)>. Acesso em 20 jun. 2022.

VELLOSO, C. K. **Avaliação do processo cervejeiro com a substituição parcial e total do lúpulo por carqueja**. São José do Rio Preto, 2020. Disponível em <[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/194241/velloso\\_ck\\_me\\_sjrp.pdf?sequence=9&isAllowed=y](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/194241/velloso_ck_me_sjrp.pdf?sequence=9&isAllowed=y)>. Acesso em 3 jun. 2022.

VERÍSSIMO, L. S. *et al.* Estudos quimiométricos sobre a degradação de lúpulo em diferentes formas de estocagem usando UV-Vis, NIRS e análises por UPLC. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 25, 16 maio 2022.

## **APÊNDICE A - PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO**

**Procedimento Operacional Padrão (POP)**

**ANÁLISE DE AMARGOR (IBU)**

**POP nº:** 001

**Página:** 01 de 04

**Versão:** 001

**Revisão:** 000

**Validade:** 2 anos

## 1. OBJETIVOS

- Padronizar a análise de amargor em amostras de cervejas e mostos produzidos no LACEMP e solicitados externamente.
- Determinar por espectrofotometria UV-vis o IBU (*International Bitterness Unit*) de cervejas artesanais e mostos.

## 2. ALCANCE

Docentes, discentes e técnicos responsáveis pela realização da análise no LACEMP.

## 3. PRINCÍPIO

**3.1** As substâncias amargas na cerveja, que são principalmente iso- $\alpha$ -ácidos, são extraídas de amostras de cerveja levemente acidificadas por extração direta (líquido-líquido) com iso-octano. Após agitação, a absorbância da camada de iso-octano é medida a 275 nm, utilizando o próprio iso-octano como “branco”.

**3.2** O método pode ser aplicado a todos os tipos de cervejas filtradas. Cervejas turvas devem ser clarificadas por centrifugação.

**3.3** Os resultados só são válidos se a cerveja não contiver os seguintes compostos conservantes: n-heptil-4-hidroxibenzoato, sacarina, ácido salicílico, ácido sórbico. Esses compostos são solúveis em iso-octano e absorvidos em 275 nm.

## 4. MATERIAIS E REAGENTES

- Agitador magnético;
- Pipeta 20 mL;
- Pipeta 10 mL;

**ANÁLISE DE AMARGOR (IBU)**

- Pipeta 1 mL;
- Erlenmeyer com tampa;
- Tubo falcon para centrífuga;
- Centrífuga;
- Cubeta;
- Espectrofotômetro na região do UV-vis;
- Amostra de cerveja e/ou mosto;
- Água grau 3;
- HCl 6 M;
- Iso-octano (2,2,4-trimetil pentano). Obs.: A absorvância deste solvente deve ser inferior a 0,010 quando medida a 275 nm contra uma referência de água.

**5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS**

**5.1** Desgaseificar as amostras de cerveja sem perda de espuma e trabalhar com as amostras a temperatura ambiente. Recomenda-se a agitação suave em agitador magnético em baixa velocidade para evitar a formação de bolhas. A adição de agentes de desgaseificação ou desgaseificação por filtração pode resultar em redução do amargor e, portanto, não é recomendada. Recipientes de plástico não devem ser usados.

**5.2** Os iso- $\alpha$ -ácidos são adsorvidos no vidro. Para cada superfície de vidro limpa (frascos novos ou completamente limpos) em que os iso- $\alpha$ -ácidos são expostos, haverá uma queda no amargor medido. Portanto, recomenda-se fazer uma ambientação das vidrarias limpas e/ou novas com um extrato de cerveja iso-octano antes de usar.

**6. PROCEDIMENTO**

**6.1** Pipetar 10 mL da amostra de cerveja (para o mosto: 5 mL da amostra + 5 mL de água);

<b>POP nº:</b> 001		<b>Página:</b> 02 de 04	
<b>Versão:</b> 001	<b>Revisão:</b> 000	<b>Validade:</b> 2 anos	

**ANÁLISE DE AMARGOR (IBU)**

**6.2** Adicionar 0,5 mL de HCl 6 M, 20 mL de isooctano e colocar sobre agitação durante 15 min (com o erlenmeyer tampado);

**6.3** Caso as fases não estejam bem separadas ao final do processo, centrifugar por 3 min a 3000 rpm;

**6.4** Medir a absorvância do extrato de isooctano a 275 nm em cubetas com 1 cm de caminho ótico, utilizando o próprio isooctano como branco. As medições de absorvância devem ser feitas dentro de 20 minutos após a centrifugação, pois atrasos adicionais afetarão os resultados;

**6.5** Anotar os valores obtidos.

**7. EXPRESSÃO DE RESULTADOS**

**7.1 Cálculos**

$$\text{Amostra de cerveja: } BU = \text{Absorvância}_{275} \times 50$$

$$\text{Amostra de mosto: } BU = \text{Absorvância}_{275} \times 100$$

**7.2 Precisão**

**Cerveja** (13 - 36 BU):

$$r = 0,44 + 0,014 m \quad R = -0,7 + 0,18 m$$

**Mosto** (18 - 42 BU):

$$r = 0,36 + 0,05 m \quad R = 0,72 + 0,14 m$$

$m = \text{média}$

**7.3 Valores padrão**

*Cerveja:* 10-40 BU de acordo com a variedade, estilo, tipo e procedência.

*Mosto:* 20-60 BU de acordo com a cerveja e utilização de compostos amargos.

**Lembrete:** para altos valores de absorvância (> 1), refaça a análise com a metade do volume da amostra e multiplique o resultado por 2 no final.

POP nº: 001		Página: 03 de 04	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

**ANÁLISE DE AMARGOR (IBU)**

**8. REFERÊNCIAS**

1. ASBC (American Society of Brewing Chemists). Analysis Methods for the Brewery Industry. Spectroquant Prove. 2017.
2. European Brewery Convention (EBC). Bitterness of Beer. 2004.
3. EBC. Analytica-EBC. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2010.

<b>POP nº: 001</b>		<b>Página: 04 de 04</b>	
<b>Versão: 001</b>	<b>Revisão: 000</b>	<b>Validade: 2 anos</b>	

**Procedimento Operacional Padrão (POP)**

**ANÁLISE DE COR (EBC)**

**POP nº: 002**

**Página: 01 de 03**

**Versão: 001**

**Revisão: 000**

**Validade: 2 anos**

## 1. OBJETIVOS

- Padronizar a análise de cor em amostras de cervejas produzidas no LACEMP e solicitadas externamente.
- Determinar por espectrofotometria UV-vis a cor (EBC) de cervejas artesanais.

## 2. ALCANCE

Docentes, discentes e técnicos responsáveis pela realização da análise no LACEMP.

## 3. PRINCÍPIO

**3.1** EBC é a sigla para *European Brewery Convention*, uma organização sem fins lucrativos que representa o setor cervejeiro europeu. Essa organização foi responsável pelo desenvolvimento da escala EBC da cerveja, que as classifica de acordo com sua coloração. De 1 a 140, a EBC abrange gradativamente todos os tons, desde a mais clara Lager até a mais escura Stout;

**3.2** Utiliza-se um espectrofotômetro UV-vis para medir a influência da luz azul escura (violeta) a 430 nm, quando passa por 1 cm de cerveja contida em uma cubeta de vidro. A cor na escala EBC é obtida pela multiplicação da absorbância pelo fator de diluição.

## 4. MATERIAIS E REAGENTES

- Espectrofotômetro na região do UV-vis;
- Suporte de filtro de membrana;
- Filtros de membrana, com poros de tamanho de 0,45 micron;
- Cubetas de 10 mm ou 5 mm;
- Água grau 3;

**ANÁLISE DE COR (EBC)**

- Reagente Kieselguhr;
- Amostra de cerveja ou mosto;

**5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS**

**5.1** Diluir a amostra para que a absorvância em 430 nm esteja dentro da linearidade do espectrofotômetro. As medições podem ser feitas em cubeta de 10 ou 5 mm; o uso de cubeta de 5 mm tem como vantagem o fato de que cervejas com valores altos na escala de cor podem ser medidas sem a necessidade de diluição da amostra;

**5.2** Filtrar a amostra através de um filtro de membrana. A filtração é desnecessária se a turbidez da amostra foi inferior a 1 EBC;

**5.3** Se necessário, clarificar a amostra adicionando o reagente Kieselguhr (1 g L<sup>-1</sup>) e fazer uma pré-filtração antes da filtração por membrana.

**6. PROCEDIMENTO**

**6.1** Configurar o comprimento de onda do espectrofotômetro 430 nm;

**6.2** Fazer a calibração com água, ajustando a absorvância para 0,00 nm;

**6.3** Ambientar e colocar a amostra pretendida na cubeta;

**6.4** Ler a absorvância e anotar os resultados obtidos.

**7. EXPRESSÃO DE RESULTADOS**

**7.1 Cálculos**

$$Cor (EBC) = A \times f \times 25$$

*A = absorvância a 430 nm em cubeta de 10 mm*

*f = fator de diluição*

ou

POP nº: 002		Página: 02 de 03	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

## Procedimento Operacional Padrão (POP)

### ANÁLISE DE COR (EBC)

$$Cor (EBC) = A \times f \times 50$$

A = absorvância a 430 nm em cubeta de 5 mm

f = fator de diluição

- Expressar os resultados em unidades EBC com 2 algarismos significativos;

#### 7.2 Precisão

Cerveja (7-16):

$$r = 0,1 \quad R = 1,52 + 0,12 m$$

m = média

SRM	2-3	3-4	5-6	6-9	10-14	17-18	19-22	22-30	30-35	30+	40+
EBC	4-6	4-8	10-12	12-18	20-28	33-36	37-43	43-59	59-69	69	79
COR	Palha	Amarelo	Ouro	Âmbar profundo, cobre	Cobre	Cobre escuro	Marrom	Marrom escuro	Marrom muito escuro	Negro	Negro opaco

Figura 1: Escala de cores de cervejas

Fonte: MAFRA, 2018

## 8. REFERÊNCIAS

- ASBC (American Society of Brewing Chemists). Analysis Methods for the Brewery Industry. Spectroquant Prove. 2017.
- European Brewery Convention (EBC). Colour of Wort: Spectrophotometric Method. 2000.
- EBC. Analytica-EBC. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2010.

POP nº: 002	Página: 03 de 03	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos

**Procedimento Operacional Padrão (POP)**

**ANÁLISE DE DICETONAS VICINAIS**

**POP nº:** 003

**Página:** 01 de 04

**Versão:** 001

**Revisão:** 000

**Validade:** 2 anos

## 1. OBJETIVOS

- Padronizar a análise de cor em amostras de cervejas produzidas no LACEMP e solicitadas externamente.
- Determinar por espectrofotometria UV-vis o teor de dicetonas vicinais em cervejas artesanais.

## 2. ALCANCE

Docentes, discentes e técnicos responsáveis pela realização da análise no LACEMP.

## 3. PRINCÍPIO

**3.1** O termo “dicetonas vicinais” engloba a soma das dicetonas 2,3-butanodiona (diacetil) e 2,3-pentanodiona. O diacetil e a pentanodiona estão presentes nos produtos secundários do metabolismo fermentativo da levedura cervejeira, e se formam através da oxidação das moléculas de 2-acetolactato e 2-acetohidroxiobutirato.

Na cerveja, em função do pH, tempo e temperatura, o 2-acetolactato é oxidado a diacetil. O diacetil formado é novamente assimilado pela levedura e reduzido para acetoína e 2,3-butanodiol.

**3.2** As dicetonas são formadas durante o processo de fermentação e sua formação está relacionada ao consumo de aminoácidos pela levedura. Assim, sua produção e redução são as principais causas de tempos elevados na etapa de fermentação e conseqüente aumento no tempo total do processo, uma vez que não se pode passar o produto para a etapa seguinte sem a completa redução das dicetonas, devido esse subproduto da fermentação ser considerado crítico, pois possui baixo

**ANÁLISE DE DICETONAS VICINAIS**

limiar de percepção e prejudica a qualidade sensorial, influenciando de forma negativa o aroma da cerveja.

**3.3** As dicetonas vicinais são destiladas da cerveja. O destilado é misturado com uma solução de o-fenilenodiamina a partir de derivados de quinoxalina. Após a acidificação, a quantidade de produtos da reação é medida espectrofotometricamente. A concentração de dicetonas vicinais é calculada com a ajuda de um fator de calibração.

**4. MATERIAIS E REAGENTES**

- Espectrofotômetro na região do UV-vis;
- Cubetas de 10 mm;
- Provetas de 25 e 100 mL;
- Tubos de ensaio;
- Pipeta volumétrica;
- Micropipeta;
- Sistema de destilação a vapor de amostras de 100 mL (Alambique ou Markham);
- Água grau 3;
- HCl 4 mol/L;
- o-fenileodiamina 10 g/L em HCl 4 mol/L (*Preparar no dia do uso e manter as soluções em local escuro. A o-fenilenodiamina é tóxica e pode causar reações alérgicas; manusear com cuidado, utilizando luvas*);
- Solução estoque de diacetil 5 g/L em água (*Armazenar a solução em frasco âmbar na geladeira. Estabilidade: 6 meses*);
- Solução padrão de diacetil 250 mg/L (*Diluir 5 mL da solução estoque em 100 mL de água em balão volumétrico. Estabilidade: 6 meses*).

**5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS**

**5.1** Amostras contendo levedura devem ser clarificadas por centrifugação ou filtração.

POP nº: 003		Página: 02 de 04	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1 Determinação

- Medir 100 mL da amostra em uma proveta e adicione ao balão de destilação;
- Destilar a amostra para obter 25 mL de destilado na proveta. O período de aquecimento deve ser de pelo menos 6 min; O tempo de destilação é de 8 a 10 min;
- Misturar o destilado e pipetar 10 mL em tubo de ensaio seco;
- Pipetar 0,5 mL de solução de o-fenilenodiamina no tubo de ensaio e homogeneizar;
- Deixar a mistura repousar em local escuro de 20 a 30 min;
- Adicionar 2 mL de HCl 4 mol/L à mistura;
- Medir a absorvância em 335 nm contra água no espectrofotômetro;
- Anotar os resultados obtidos (**Ap - Absorvância do procedimento**).

### 6.2 Teste em Branco

- Paralelamente ao procedimento, realizar um teste em branco, utilizando água ao invés do destilado;
- Proceder conforme o tópico **procedimento** descrito anteriormente (6.1 a 6.7);
- Anotar os resultados obtidos (**Ab - Absorvância do branco**).

### 6.3 Calibração

- Pipetar 9,9 mL de água para um tubo de ensaio seco;
- Adicionar 0,10 mL da solução padrão de diacetil e homogeneizar;
- Proceder conforme o tópico **procedimento** descrito anteriormente (6.1 a 6.7);
- Anotar os resultados obtidos (**Ac - Absorvância da calibração**).

## 7. EXPRESSÃO DE RESULTADOS

### 7.1 Cálculos

O teor de dicetonas vicinais, expresso em mg/L, é dado pela fórmula:

$$VDK = \frac{A_p - A_b}{A_c - A_b} \cdot 0,625$$

$A_p$ : Absorbância do procedimento

$A_b$ : Absorbância do branco

$A_c$ : Absorbância da calibração

Se o denominador da fórmula ( $A_c - A_b$ ) se desviar consideravelmente de 0,230, a razão deve ser investigada fazendo uma nova solução de diacetil recém-destillado;

Expresse os resultados com 2 casas decimais.

### 7.2 Precisão

$$(0,06 - 0,13): r = 0,02 \quad R = 0,06$$

## 8. REFERÊNCIAS

1. ASBC (American Society of Brewing Chemists). Analysis Methods for the Brewery Industry. Spectroquant Prove. 2017.
2. European Brewery Convention (EBC). Vicinal Diketones in Beer: Spectrophotometric Method. 2000.
3. EBC. Analytica-EBC. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2010.
4. MEDEIROS, Claudio Dantas de. Effect of process variables in fermentation time and in total vicinal diketones concentration. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

POP nº: 003		Página: 03 de 04	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

**Procedimento Operacional Padrão (POP)**

**ANÁLISE DE POLIFENÓIS TOTAIS**

**POP nº: 004**

**Página: 01 de 05**

**Versão: 001**

**Revisão: 000**

**Validade: 2 anos**

## 1. OBJETIVOS

- Padronizar a análise de polifenóis totais em amostras de cervejas produzidas no LACEMP e solicitadas externamente.
- Determinar por espectrofotometria UV-vis o teor de polifenóis totais presentes em cervejas artesanais.

## 2. ALCANCE

Docentes, discentes e técnicos responsáveis pela realização da análise no LACEMP.

## 3. PRINCÍPIO

**3.1** Os polifenóis de baixo peso molecular são antioxidantes naturais e contribuem em grande parte no poder redutor durante a mosturação, protegendo a cerveja contra a oxidação e melhorando a estabilidade das propriedades físico-químicas. O poder redutor decresce com o aumento do peso molecular e alguns polifenóis são antioxidantes por sua habilidade em quelar íons metálicos e outros são considerados pró-oxidantes devido à sua capacidade de transferir elétrons para íons metálicos.

Os compostos fenólicos estão presentes em plantas que podem ser consumidas por humanos e tem como função reduzir radicais livres – que danificam tecidos orgânicos –, prevenir contra danos macromoleculares e prevenir a diminuição da atividade enzimática antioxidante no cérebro e no fígado. Os polifenóis não estão presentes somente em vegetais, mas também em cereais, como a cevada, que origina o malte para a produção de cerveja. O conteúdo total de antioxidantes depende do tipo de cerveja, das matérias-primas e do tipo de fabricação utilizado.

**ANÁLISE DE POLIFENÓIS TOTAIS**

Cerca de 70-80 % dos polifenóis da cerveja provém do malte e 20-30 % do lúpulo.

**3.2** Tratamento da amostra com solução de carboximetilcelulose e EDTA.

**3.3** Reação de polifenóis com íons férricos em solução alcalina. Medição da absorbância a 600 nm da solução de cor vermelha contra uma solução em branco.

**4. MATERIAIS E REAGENTES**

- Espectrofotômetro na região do UV-vis;
- Centrífuga;
- Cubetas de 10 mm;
- Balões volumétricos graduados e com tampa, de 25 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL;
- Pipetas graduadas de 0,5 mL, 1 mL, 10 mL e 25 mL;
- Pipetas de 1 mL e 10 mL;
- Água grau 3;
- Carboximetilcelulose/ácido etilenodiaminotetracético (CMC/EDTA) 10 g/L (CMC de sódio, contendo 2 g/L de EDTA). *Preparar a solução fresca a cada mês. Adicionar lentamente 10 g de CMC de sódio e 2 g de EDTA dissódico a 500 mL de água, sob agitação. Quando todo o material sólido estiver dissolvido, após repouso de 1 a 3h, agitação, ou homogeneização, transferir para balão volumétrico de 1 L e completar com água. Se necessário clarificar a solução por centrifugação;*
- Reagente férrico 5,6 g/L de Fe<sup>3+</sup>. *Dissolver 3,5 g de citrato de ferro amônio verde (16 % de ferro) em 100 ml de água. A solução deve ser completamente límpida. Preparar fresco a cada semana (ou com mais frequência) e guardar em vidro e local escuro;*
- Reagente amoníaco, *diluir 100 mL de amoníaco concentrado (d= 0,92g/mL) em 300 mL de água.*

POP nº: 004		Página: 02 de 05	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

## 5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

- 5.1 Desgaseificar a amostra de cerveja por agitação;
- 5.2 Clarificar amostras turvas por centrifugação e não por filtração;
- 5.3 Utilizar a cerveja desgaseificada em temperatura de 20°C.

## 6. PROCEDIMENTO

### 6.1 Amostra de Medição

- Pipetar 10 mL da amostra e 8 mL de reagente CMC/EDTA em um balão volumétrico de 25 mL;
- Tampar e homogeneizar bem o conteúdo;

### 6.2 Diluição da Amostra

- Se o teor de polifenóis for superior a 400 mg/L é necessário diluir a amostra;
- Utilizar balões volumétricos graduados de 50 mL para a amostra e as soluções em branco;
- Após a adição do CMC/EDTA e dos reagentes férricos, adicionar 25 mL de água;
- Homogeneizar bem e adicionar o reagente de amônia;

### 6.3 Determinação

- Adicionar 0,5 mL de reagente férrico à amostra de medição e homogeneizar;
- Adicionar 0,5 mL de reagente amoníaco e homogeneizar;
- Completar até 25 mL (ou 50 mL) com água e misturar;
- Deixar em repouso por 10 min e medir a absorbância a 600 nm. Certifique-se de que a solução a ser medida é límpida.

POP nº: 004		Página: 03 de 05	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

#### 6.4 Amostra em Branco

- Misturar 20 mL da amostra de cerveja e 8 mL de reagente CMC/EDTA em um balão volumétrico de 25 ou 50 mL;
- Adicionar 0,5 mL de reagente amoníaco e homogeneizar. Completar o volume até 25 ou 50 mL com água;
- Deixar em repouso por 10 min e medir a absorbância a 600 nm. Certifique-se de que a solução a ser medida é límpida.

### 7. EXPRESSÃO DE RESULTADOS

#### 7.1 Cálculos

Obtenha o teor de polifenóis usando a fórmula:

$$P = A \times 820 \times f$$

$$P = \text{teor de polifenóis (mg/L)}$$

$$A = \text{absorbância a 600}$$

$$f = \text{fator de diluição (2 se for usado um balão volumétrico de 50 mL)}$$

#### 7.2 Precisão

$$(73 - 176 \text{ mg/L}): r = 4,1 \text{ mg/L } R = 18 + 0,13 m$$

$$m = \text{média}$$

### 8. REFERÊNCIAS

1. ASBC (American Society of Brewing Chemists). Analysis Methods for the Brewery Industry. Spectroquant Pro. 2017.
2. European Brewery Convention (EBC). Total Polyphenols in Beer by Spectrophotometry (IM). 2002.
3. EBC. Analytica-EBC. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2010.
4. FEISTAUER, Lucas Brambilla Hilbig. Propriedades antioxidantes da cerveja artesanal. Porto Alegre, 2016. Disponível em <<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/147871/001000713.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

POP nº: 004	Página: 04 de 05	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos

**ANÁLISE DE POLIFENÓIS TOTAIS**

5. VIEIRA, Anderson Eduardo de Oliveira. Controle de qualidade físico-químico de cerveja de uma indústria paraense. Belém, 2015. Disponível em <[https://bdm.ufpa.br:8443/jspui/bitstream/prefix/2607/1/TCC\\_ContrôleQualidadeFísico-químico.pdf](https://bdm.ufpa.br:8443/jspui/bitstream/prefix/2607/1/TCC_ContrôleQualidadeFísico-químico.pdf)>.

<b>POP nº: 004</b>		<b>Página: 05 de 05</b>	
<b>Versão: 001</b>	<b>Revisão: 000</b>	<b>Validade: 2 anos</b>	

**Procedimento Operacional Padrão (POP)**

**ANÁLISE DE FLAVONOIDES**

**POP nº:** 005

**Página:** 01 de 04

**Versão:** 001

**Revisão:** 000

**Validade:** 2 anos

## 1. OBJETIVOS

- Padronizar a análise de flavonoides em amostras de cervejas produzidas no LACEMP e solicitadas externamente.
- Determinar por espectrofotometria UV-vis o teor de flavonoides em cervejas artesanais.

## 2. ALCANCE

Docentes, discentes e técnicos responsáveis pela realização da análise no LACEMP.

## 3. PRINCÍPIO

**3.1** Os principais polifenóis presentes na cerveja provém essencialmente da casca de cevada malteada e do lúpulo. São ácidos fenólicos, flavonoides de três tipos: flavanóis (catequinas e epicatequinas), as antocianinas entre elas estão a pelargonidina, malvidina, leucocianidinas e leucopelargonidina e seus derivados produtos de oxidação (como as chalconas) e os flavonóis (quercitina, kampferol, mircetina). Também aparecem compostos mais complexos como os taninos sendo os mais importantes as proantocianidinas de diversos graus de polimerização. Os antioxidantes naturais presentes nas cervejas, exercem, entre outras, uma função protetora de qualidade sensorial da cerveja, evitando deterioração oxidativa de sua qualidade.

**3.2** Em condições ácidas, o cromógeno p-dimetilaminocinamaldeído reage com flavonoides como a (+)-catequina, para formar pigmentos coloridos.

**3.3** O método permite uma determinação quantitativa dos precursores de turbidez de catequina e proantocianidina, enquanto flavanóis e glicosídeos de flavonol não

## ANÁLISE DE FLAVONOIDES

são estimados.

**3.4** A cerveja diluída é misturada com uma solução ácida do cromógeno e os pigmentos resultantes são determinados pela medição da absorbância da mistura.

**3.5** A concentração de flavonoides é determinada diretamente por meio de uma equação de regressão. Como o método foi calibrado com (+)-catequina, todos os resultados são equivalentes a esta.

### 4. MATERIAIS E REAGENTES

- Espectrofotômetro na região do UV-vis;
- Cubetas de 10 mm;
- Proveta de 250 mL;
- Balões volumétricos de 100 mL e 500 mL;
- Pipetas volumétricas de 1 mL, 5 mL e 10 mL;
- Erlenmeyer de 1000 mL;
- Água grau 3;
- HCl concentrado,  $d = 1,19$ ;
- Metanol;
- p-dimetilaminocinamaldeído
- Solução de cromógeno 1g/L (*Dissolver p-dimetilaminocinamaldeído (500 mg) numa mistura previamente resfriada de 125 mL de HCl concentrado e 350 mL de metanol. Diluir a solução para um volume final de 500 mL com metanol. Preparar o reagente fresco uma vez por semana e armazenar o reagente sob abrigo da luz.*)

### 5. PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS

**5.1** Trabalhar com a amostra de cerveja a cerca de 20°C;

**5.2** Desgaseificar a amostra em erlenmeyer com sob balanço suave e depois intenso;

POP nº: 005		Página: 02 de 04	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

**ANÁLISE DE FLAVONOIDES**

5.3 Não desgaseificar por filtração, pois o papel absorve flavonoides.

**6. PROCEDIMENTO**

**6.1 Diluição**

- Pipetar 10 mL de cerveja desgaseificada para um balão volumétrico de 100 mL;
- Completar até 100 mL com água.

**6.2 Reação e Estimativa Espectrofotométrica**

- Pipetar 1 mL da amostra de cerveja diluída em tubo de ensaio;
- Adicionar 5 mL do reagente cromógeno e homogeneizar;
- Após 10 min, transferir para uma cubeta de 10 mm e ler a absorbância a 640 nm.

**6.3 Teste em Branco**

- Misturar 1 mL de água com 5 mL do reagente cromógeno;
- Transferir o conteúdo para uma cubeta de 10 mm e ler a absorbância a 640 nm. Realizar determinações em duplicata.

**7. EXPRESSÃO DE RESULTADOS**

**7.1 Cálculos**

Calcule o conteúdo de flavonoides como:

$$\text{Flavonoides (equivalentes a catequina)} = 335 (A_p - A_b)$$

*A<sub>p</sub>*: Absorbância do procedimento

*A<sub>b</sub>*: Absorbância do branco

Expresse os resultados em mg/L com 1 casa decimal.

**7.2 Precisão**

POP nº: 005		Página: 03 de 04	
Versão: 001	Revisão: 000	Validade: 2 anos	

**ANÁLISE DE FLAVONOIDES**

*Coefficiente de variação do erro de repetibilidade (CVSr) = ± 4,7 %*

*Coefficiente de variação do erro de reprodutibilidade (CVSR) = ± 7,6%*

**8. REFERÊNCIAS**

1. ASBC (American Society of Brewing Chemists). Analysis Methods for the Brewery Industry. Spectroquant Prove. 2017.
2. European Brewery Convention (EBC). Flavanoids in Beer by Spectrophotometry. 1997.
3. EBC. Analytica-EBC. Nürnberg: Fachverlag Hans Carl, 2010.
4. DE FREITAS, Gisele Laisa. Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum vulgare L.*) e no bagaço de brassagem. Florianópolis, 2006. Disponível em <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/88407/231715.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>.

<b>POP nº: 005</b>		<b>Página: 04 de 04</b>	
<b>Versão: 001</b>	<b>Revisão: 000</b>	<b>Validade: 2 anos</b>	