



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Engenharia de Alimentos

MARIANA BARRETO CARVALHAL PINTO

ISOMERIZAÇÃO DE ÁCIDOS AMARGOS DE LÚPULO CASCADE
CULTIVADO NO BRASIL E SEU DESEMPENHO DURANTE A FERMENTAÇÃO DA
CERVEJA

CAMPINAS
2018

MARIANA BARRETO CARVALHAL PINTO

ISOMERIZAÇÃO DE ÁCIDOS AMARGOS DE LÚPULO CASCADE
CULTIVADO NO BRASIL E SEU DESEMPENHO DURANTE A FERMENTAÇÃO DA
CERVEJA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em
Tecnologia de alimentos

Orientador: Flávio Luis Schmidt

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO MARIANA BARRETO CARVALHAL
PINTO, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
FLÁVIO LUIS SCHMIDT

CAMPINAS
2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 132109/2016-6

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

P658i Pinto, Mariana Barreto Carvalho, 1992-
Isomerização de ácidos amargos de lúpulo cascade cultivado no Brasil e seu desempenho durante a fermentação da cerveja / Mariana Barreto Carvalho Pinto. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Flávio Luís Schmidt.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cerveja. 2. Lúpulos. 3. Alfa-ácidos. I. Schmidt, Flávio Luís. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Bitter acids isomerization of Cascade hops cultivated in Brazil and their performance during beer fermentation

Palavras-chave em inglês:

Beer

Hops

Alpha acids

Área de concentração: Tecnologia de Alimentos

Titulação: Mestra em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora:

Flávio Luís Schmidt [Orientador]

Stanislau Bogusz Junior

André Luis Marangoni

Data de defesa: 19-03-2018

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia de Alimentos

FICHA DE APROVAÇÃO COM OS MEMBROS DA BANCA

FLÁVIO LUÍS SCHMIDT

Orientador

FEA/UNICAMP – CAMPINAS/SP

ANDRÉ LUIS MARANGONI

Membro titular

PESQUISADOR – CAMPINAS/SP

STANISLAU BOGUSZ JUNIOR

Membro titular

USP – SÃO CARLOS/SP

*Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

Durante o desenvolvimento desta dissertação recebi apoio de pessoas diversas, as quais foram de suma importância para a finalização desta. Primeiramente agradeço aos meus pais por me ampararem todo o momento e por estarem sempre ao meu lado e às minhas irmãs por me oferecerem suporte emocional.

Agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Frutas do DTA da Faculdade de Engenharia de Alimentos, os quais me auxiliaram durante o desenvolvimento de meus experimentos com informações cruciais para o projeto. Além disso, agradeço à equipe do Laboratório de Química Inorgânica e Analítica do Instituto de Química da USP – São Carlos que me auxiliaram no desenvolvimento das análises. E agradeço ao meu orientador por me auxiliar durante o desenvolvimento de todo o projeto.

Agradeço aos meus colegas de república da Réptil Durval e também meus amigos da república Tipo1bar, por me ajudarem nos momentos de distração e quando necessitei de apoio emocional. Agradeço aos amigos de graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos, principalmente aquelas que ainda moram em Campinas, e aos amigos da pós-graduação da Unicamp.

Agradeço à agência CNPq pela aporte financeiro por meio de bolsa de estudos, auxiliando na manutenção do projeto.

RESUMO

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo e o consumidor brasileiro tem mudado seu hábito de consumo de cerveja ao longo do tempo, tendo preferência por cervejas especiais, as quais utilizam maiores quantidades de lúpulo. Este é um dos insumos utilizados na produção, o qual confere aroma característico e sabor amargo ao produto, dentre outras propriedades tecnológicas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar o comportamento de humulonas e lupulonas, que conferem amargor, ao longo das etapas de fervura e fermentação na produção da cerveja. Para tal, os experimentos foram divididos em duas etapas, sendo uma de isomerização dos ácidos amargos do lúpulo e outra a fermentação. A primeira foi desenvolvida a partir da fervura de um mosto à 100 °C preparado com densidade ajustada para 8,7 °Brix, ao qual foi adicionado lúpulo Cascade produzido no Brasil e outro nos EUA e também um padrão de humulonas e lupulonas. Foram retiradas 8 alíquotas ao longo da fervura, nos tempos 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos após o início da fervura e congeladas imediatamente em N₂ líquido. As amostras foram descongeladas e procedeu-se as análises da concentração de ácidos amargos e seus isômeros em cada ensaio, por HPLC. Na segunda etapa elaborou-se a fermentação de um mosto padrão preparado com densidade inicial ajustada para 8,7 °Brix, onde houveram dois ensaios também com o lúpulo Cascade brasileiro e o lúpulo Cascade americano adicionados na concentração de 1 g/L. Para a fermentação utilizou-se um *starter* de leveduras ale neutras (US-05), e a fermentação à 20°C por 8 dias e posteriormente a maturação cerca de 5 °C em câmara fria até completar 21. Foram retiradas alíquotas diárias de 100 mL para a análise da concentração de iso- α -ácidos, % de álcool, % de extrato e densidades ao longo da fermentação. A partir dos resultados obtidos na primeira etapa do experimento, observou-se que houve diferença na % de utilização dos ácidos amargos e consequentemente a concentração de iso- α -ácidos de acordo com a forma de lúpulo utilizada, flor ou peletizado. Sendo assim, o lúpulo em flor possui menor % de utilização, enquanto que o extrato de lúpulo tem maior disponibilidade dos ácidos amargos ao longo da isomerização. Além disso, constatou-se que a reação de isomerização segue uma reação cinética de primeira ordem. Na segunda etapa, por sua vez, verificou-se uma cinética do processo de fermentação demonstrado pelo consumo de extrato e produção de etanol ao longo desta etapa. Durante a fermentação também se observou a perda de amargor, principalmente nos primeiros dias, da fermentação. Os resultados obtidos auxiliam o entendimento do comportamento dos componentes do lúpulo brasileiro ao longo do processamento de cerveja.

ABSTRACT

Beer is one of the most consumed beverages in the world and the Brazilian consumer has changed its habit of beer consumption over time, preferring special beers, which use larger amounts of hops. This is one of the inputs used in the production, which confers a characteristic aroma and bitter taste to the product, among other technological properties. In this context, this work had as objective to evaluate the behavior of humulones and lupulones, which confer bitterness, throughout the stages of boiling and fermentation in the beer production. For this, the experiments were divided in two stages, one of isomerization of the bitter acids of hops and another the fermentation. The first one was developed from the boiling of a wort at 100 ° C prepared with density adjusted to 8.7 ° Brix, to which was added Cascade hops produced in Brazil and another in the USA and also a pattern of humulones and lupulones. 8 aliquots were taken along the boil at times 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 and 90 minutes after boiling commenced and immediately frozen in liquid N₂. Samples were thawed and bitter acid concentrations and isomers were analyzed in each assay by HPLC. In the second stage the fermentation of a standard wort prepared with initial density adjusted to 8.7 ° Brix was elaborated, where there were also two tests with the Brazilian Cascade hops and the American Cascade hops added in the concentration of 1 g / L. For fermentation a neutral yeast starter (US-05) was used, and fermentation at 20 ° C for 8 days was developed and then maturation at about 5 ° C in a cold chamber until completion of 21. Daily aliquots of 100 mL for the analysis of the concentration of iso- α -acids, % alcohol, % of extract and densities throughout the fermentation. From the results obtained in the first stage of the experiment, it was observed that there was difference in the percentage of use of bitter acids and consequently the concentration of iso- α -acids according to the form of hops used, flower or pellet. Therefore, the hops in flower have a lower % of utilization, whereas the hop extract has a greater availability of the bitter acids along the isomerization. In addition, it was found that the isomerization reaction follows a first-order kinetic reaction. In the second step, in turn, a kinetics of the fermentation process demonstrated by the consumption of extract and ethanol production was verified during this stage. During the fermentation also the loss of bitterness, mainly in the first days, of the fermentation was observed. The results obtained help to understand the behavior of Brazilian hops components during beer processing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura do alfa-ácido	22
Figura 2 - Isomerização de humulona em isohumulona	23
Figura 3 - Estrutura dos componentes dos beta-ácidos	24
Figura 4 - Terpenos majoritários dos óleos essenciais	25
Figura 5 - Estereoisômeros do linalol	27
Figura 6 - Estrutura dos principais polifenóis para a produção de cerveja.....	29
Figura 7 - Vias metabólicas anaeróbica e anaeróbica de leveduras.....	38
Figura 8 - Aparato utilizado para isomerização de lúpulo.....	43
Figura 9 - Frasco com amostra de fermentação.....	47
Figura 10 - Cromatograma e estruturas das humulonas e lupulonas presentes no padrão ICE-3. 1 – Cohumulona; 2 e 3 – Humulona + Adhumulona; 4 – Colupulona; 5 e 6 – Lupulona + Adlupulona	50
Figura 11 - Concentração de alfa-ácidos do lúpulo Cascade brasileiro em flor ao longo da etapa de fervura	51
Figura 12 - Concentração de alfa-ácidos do lúpulo Cascade americano em pellets ao longo da etapa de fervura.....	52
Figura 13 - Concentração de alfa-ácidos do padrão de alfa- e beta ácidos ICE-3 em extrato ao longo da etapa de fervura.....	52
Figura 14 - Concentração do total de alfa-ácidos em relação ao tempo de fervura.....	53
Figura 15 - Cromatograma e estrutura das iso-humulona. 1 – Isocohumulona; 2 e 3 – Isohumulona + Isoadhumulona	54
Figura 16 - Espectro de UV dos dois picos das espécies químicas iso-cohumulona (A), isohumulona, iso-adhumulona (B) e do pico desconhecido (C)	55
Figura 17 - Reação de isomerização do alfa-ácido pelo aquecimento.....	56
Figura 18 - Concentração de iso-alfa-ácidos do padrão de alfa- e beta-ácidos ICE-3 em mosto	58
Figura 19 - Concentração de iso-alfa-ácidos do lúpulo Cascade americano em mosto	58
Figura 20 - Concentração de iso-alfa-ácidos do lúpulo cascade brasileiro em mosto.....	58
Figura 22 - Consumo de açúcar ao longo da fermentação de mosto adicionado com o lúpulo Cascade brasileiro.....	60
Figura 23 - Consumo de açúcar ao longo da fermentação de mosto adicionado com o lúpulo Cascade americano	60

Figura 24 - Fases da fermentação de acordo com a densidade do mosto em relação ao tempo	62
Figura 25 - Produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade brasileiro ao longo da fermentação.....	65
Figura 26 - Cinética de produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade brasileiro nos primeiros 6 dias de fermentação	65
Figura 27 - Produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade americano ao longo da fermentação	66
Figura 28 - Cinética de produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade americano nos primeiros 6 dias de fermentação	66
Figura 29 - Aumento do teor de álcool (P) em relação ao extrato (S) no mosto fermentado com lúpulo Cascade brasileiro.....	67
Figura 30 - Aumento do teor de álcool (P) em relação ao extrato (S) no mosto fermentado com lúpulo Cascade americano	68
Figura 31 - Concentração de iso-alfa-ácido ao longo da fermentação	70
Figura 32 - concentrações de humulonas em tampão ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura.	75
Figura 33 - Concentrações de humulonas em tampão ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura	76
Figura 34 - Concentrações de iso-humulonas em tampão de ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura	78
Figura 35 - Concentrações de iso-humulonas em tampão de ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura	79
Figura 36 - Curva de calibração da cohumulona	80
Figura 37 - Curva de calibração da Humulona+adhumulona.....	80
Figura 38 - curva de calibração da iso-cohumulona.....	81
Figura 39 - curva de calibração da iso-n+adhumulona.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Preço do lúpulo em comparação com preço do malte	33
Tabela 2 - Levedura US-05 Fermentis.....	39
Tabela 3 - Caracterização do extrato de malte.....	40
Tabela 4 - Quantidade utilizada de lúpulo e padrão	44
Tabela 5 - dados lúpulo Cascade brasileiro em comparação com Cascade americano	48
Tabela 6 - Concentração de alfa-ácidos utilizada nos experimentos	49
Tabela 7 - fator de utilização de alfa-ácido em relação ao tempo de fervura	54
Tabela 8 - Coeficiente k calculado para os diferentes tipos de lúpulos	56
Tabela 9 - Equação da concentração de iso-alfa-ácido em relação ao tempo à 100°C para cada tipo de lúpulo.....	57
Tabela 10 - % de utilização dos iso-alfa-ácidos em relação à concentração inicial de alfa-ácido	59
Tabela 10 - Dados de álcool, extrato e densidades do mosto com lúpulo Cascade brasileiro durante a fermentação.....	62
Tabela 11 - Dados de álcool, extrato e densidades do mosto com lúpulo Cascade americano durante a fermentação.....	63
Tabela 12 - RDF (grau real de fermentação) dos ensaios feitos com lúpulo Cascade brasileiro e lúpulo Cascade americano ao longo da fermentação.....	69
Tabela 13 - Resultados de concentração (média \pm desvio padrão) de humulonas em tampão ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura.	74
Tabela 14 - Resultados de concentração (média \pm desvio padrão) de humulonas em tampão ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura.	76
Tabela 15 - Resultados de concentração (média \pm desvio padrão) de iso-humulonas em tampão ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura.....	77
Tabela 16 - Resultados de concentração (média \pm desvio padrão) de iso-humulonas em tampão ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura.....	78
Tabela 17 - Concentrações utilizadas para construir as curvas de calibração para quantificação de humulonas	80
Tabela 18 - Figuras de mérito de faixa linear, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para humulonas.	81
Tabela 19 - Concentrações utilizadas para construir as curvas de calibração para quantificação de iso-humulonas e iso-lupulonas.	81

Tabela 20 - Figuras de mérito de faixa linear, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para iso-humulonas.....	82
---	----

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
2.	OBJETIVOS	17
2.1.	Geral.....	17
2.2.	Específicos	17
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1.	Sabores e Aromas da Cerveja	18
3.2.	Lúpulo: componentes que afetam o sabor	19
3.2.1.	Ácidos Amargos	21
3.2.2.	Óleos Essenciais	25
3.2.3.	Polifenóis	27
3.3.	Relação dos sabores com estilos.....	30
3.4.	Importância do lúpulo brasileiro.....	33
3.5.	Processamento da cerveja	34
3.5.1.	Mostura	34
3.5.2.	Fervura.....	35
3.5.3.	Fermentação.....	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1.	caracterização da matéria prima	39
4.1.1.	Lúpulo.....	39
4.1.2.	Levedura	39
4.1.3.	Extrato de malte	40
4.2.	Análises no lúpulo	40
4.2.1.	Determinação do teor de α - e β -ácidos	40
4.2.2.	Determinação do teor de óleos essenciais.....	41
4.3.	Análises do mosto isomerizado	42
4.3.1.	Isomerização	42

4.3.2. Quantificação do teor de α -ácidos	45
4.3.3. Quantificação do teor de iso- α -ácidos	45
4.4. Preparação do mosto fermentado.....	46
4.4.1. Preparo do Starter de levedura.....	46
4.4.2. Preparo do mosto fermentado	46
4.5. Análises da cerveja	47
4.5.1. Quantificação do teor de iso- α -ácidos na cerveja.....	47
4.5.2. Análise de extrato e álcool na cerveja	48
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1. Lúpulo.....	48
5.2. Isomerização	49
5.2.1. Total de alfa-ácido	49
5.2.2. Total de iso- α -ácido	54
5.3. Fermentação.....	59
5.3.1. Cinética da fermentação alcoólica	59
5.3.2. Rendimento da produção de álcool.....	67
5.3.3. Concentração de iso- α -ácidos	69
6. CONCLUSÃO	71
7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	71
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE A.....	74
APÊNDICE B	80

1. INTRODUÇÃO

O consumo de bebidas alcoólicas fermentadas estende-se através dos séculos com origem em sociedades milenares. Dentre essas bebidas, encontra-se a cerveja, a qual desde seus primórdios foi considerada tanto alimento como bebida. Apesar de inúmeras variações de estilos e ingredientes, pela legislação brasileira ela é definida basicamente por uma bebida alcoólica fermentada por leveduras do gênero *Saccharomyces*, a partir de um mosto preparado de malte de cereais, principalmente a cevada, juntamente com outras matérias-primas amiláceas ou açucaradas, adicionando flores de lúpulo ou seus derivados e água potável (MAPA, 1996; MEGA, 2011).

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, com uma produção mundial de 196 bilhões de litros em 2014, tornando o setor um dos mais rentáveis. O maior país produtor é a China (49,2 bilhões de litros), seguido pelos Estados Unidos (22,6 bilhões de litros). Entretanto, tais países não se caracterizam como os maiores mercados consumidores (per capita), sendo a República Tcheca o maior consumidor (147,1 litros per capita em 2014), em segundo lugar está a Namíbia, com 108,9 litros per capita e em terceiro lugar a Áustria (105,9 litros per capita) (BECK, 2015; CERVBRAZIL, 2015).

O Brasil, por sua vez, se situa como o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com uma produção anual de 14 bilhões de litros em 2014. O Brasil vem ganhando destaque no setor de cerveja ao longo dos últimos anos, visto que houve um crescimento da produção de 5% ao ano nos últimos dez anos. Porém, novamente em relação ao consumo per capita, o país não se situa em uma posição elevada ficando em 27º com consumo de 66,9 litros por pessoa em 2014. Apesar disso, a cerveja no Brasil é tida como a bebida que é a “cara do brasileiro”, já que foi preferida por 59% dos brasileiros entrevistados em um estudo realizado pelo Ibope Inteligência (CERVBRAZIL, 2015).

O setor cervejeiro movimenta uma grande cadeia de valor, não atingindo somente a indústria da cerveja, como também a comercialização de insumos e a distribuição do produto. Portanto, há a geração de empregos e renda relacionados ao setor, envolvendo indiretamente outros setores, como construção civil e energia. A indústria cervejeira pode ser dividida de acordo com seu porte e capacidade, sendo denominada desde micro cervejarias a cervejarias multinacionais (CERVBRAZIL, 2015).

O consumidor brasileiro tem alterado seu hábito alimentar nas últimas décadas preferindo produtos com mais qualidade, mesmo que sejam mais onerosos. Essa mudança ocorreu também no setor cervejeiro, com o aumento do mercado de cervejas especiais, ou seja, aquelas que são

produzidas com ingredientes selecionados, com estilos antes desconhecidos e, em sua maioria, produzidos por processos artesanais. Seguindo este movimento, houve o incremento do número de cervejarias artesanais, assim como, de *homebrewers*, os quais produzem sua própria cerveja. O reflexo dessa nova cultura é percebido no crescimento do mercado de cervejas especiais, com um crescimento médio de 14% no ano de 2011. Segundo a Abrabe (Associação de Brasileira de Bebidas), há uma estimativa de 280 micro cervejarias no país, localizadas principalmente nas regiões sul e sudeste (FERREIRA, 2011; ABRABE, 2016).

O aumento do consumo de cervejas especiais está intrinsecamente relacionado com o prazer que o produto pode gerar, além do resgate da cultura por trás deste hábito. Isto é, ao produzir um produto artesanal, o empreendedor se atenta a produzir uma cerveja que tenha uma característica especial, selecionando insumos com maior qualidade. Outros ingredientes também podem ser acrescentados, como suco de frutas, produtos de origem animal, como mel, entre outros. A cerveja especial, assim, pode ter inúmeras variações sensoriais, mesmo quando produzida de acordo com a *Lei da Pureza Alemã*, utilizando somente com os insumos originais (malte, lúpulo, água e levedura), agradando o consumidor em busca de produtos diferenciados (CARVALHO, 2015).

A cerveja mais consumida dentre o setor cervejeiro ao todo é a denominada *Pilsen*, a qual é uma *Lager* com cor clara, sabor suave e leve amargor. Entretanto, o consumidor de cervejas especiais procura a descoberta e inserção de novos estilos ao seu paladar, o que caracteriza o tipo da cerveja como o segundo atributo mais relevante no momento da compra. Sendo assim, o tipo de cerveja mais preferido pelos consumidores brasileiros são as cervejas *Pale Ale*, dentro do qual está inserido o estilo *Indian Pale Ale*, o qual é altamente lupulado e de elevado amargor (CARVALHO, 2015).

O aspecto que mais chama a atenção para o consumo de cervejas especiais é seu perfil sensorial diferenciado, o qual está diretamente relacionado aos ingredientes utilizados, caracterizando uma dependência das micro cervejarias quanto aos insumos, principalmente o malte, lúpulo e levedura. A qualidade da bebida advém do equilíbrio entre os compostos de aroma e sabor (voláteis e não voláteis), como ésteres, aldeídos, ácidos orgânicos e α -ácidos. Tais compostos são formados ao longo de todas as etapas do processo, sendo importante o total controle sobre essas. Por outro lado, os ingredientes mal selecionados também podem causar *off-flavor* ao produto final, o que pode ser um problema para a indústria cervejeira (ARAÚJO, 2003).

O insumo mais importante para a produção de cerveja são as fontes de carboidrato, pois, dão origem ao substrato utilizado pelas leveduras. Entretanto, o uso do lúpulo contribui diretamente para o perfil sensorial da cerveja, caracterizando a sua singularidade. Este ingrediente proporciona o amargor do produto, através da isomerização de seus ácidos, assim como características específicas de aroma com alguns compostos voláteis. Mais especificamente, os compostos de amargor do lúpulo são basicamente representados pelos α -ácidos e β -ácidos, sendo a intensidade do amargor relacionada diretamente com a quantidade presente desses compostos. Por outro lado, o aroma também é uma característica interessante do lúpulo, proveniente dos seus óleos essenciais. O perfil sensorial da cerveja, portanto, depende diretamente da intensidade e qualidade desses compostos presentes no lúpulo. A intensidade depende da quantidade de lúpulo adicionado e da prática utilizada, enquanto a qualidade depende da variedade, do modo de estocagem e processamento do lúpulo. Isto é, como os óleos são altamente voláteis, há uma perda considerável ao longo do tempo de estocagem (BAMFORTH, 2009).

O lúpulo, por sua vez, é uma planta da espécie *Humulus lupulos*, o qual possui uma substância denominada lupulina em suas flores femininas, tornando-o interessante para a indústria cervejeira. Na produção de cerveja, o lúpulo pode ser utilizado no formato de *pellets*, extrato ou mesmo suas flores inteiras (RODRIGES, 2015).

O Brasil, atualmente, importa toda sua demanda de lúpulo de países como EUA e Alemanha, o que o torna mais caro e com qualidade reduzida, devido ao tempo de armazenamento e transporte. O país possui uma produção insipiente de lúpulo, a qual enfrenta certa dificuldade, visto que a planta tem demandas específicas de clima (exposição ao frio intenso durante o inverno) e de luz solar, necessitando de cerca de 17h de luz solar durante sua floração. Entretanto, certas variedades têm se adaptado ao clima do Brasil e conseguiu-se uma baixa produção (RODRIGUES, 2015).

A produção de lúpulo nacional, portanto, tem papel fundamental para indústria cervejeira, influenciando diretamente na qualidade do produto final, já que seu período de estocagem é relativamente baixo, preservando seus óleos aromáticos, além da redução do custo do insumo. Embora, ainda não se tenha conhecimento sobre suas características de amargor e aroma, ele poderá ser amplamente utilizado em cervejas especiais, provocando um perfil sensorial específico

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O objetivo geral deste trabalho é delinear o perfil e o comportamento dos ácidos amargos do lúpulo da variedade Cascade cultivado no Brasil.

2.2. Específicos

- Quantificar por HPLC o teor de α -ácidos (cohumolona, adhumulona + humulona) e β -ácidos (colupulona e adlupulona + lupulona) do lúpulo brasileiro e compará-lo com o lúpulo americano de mesma variedade.
- Identificar e quantificar os α -ácidos do lúpulo ao longo da fervura por HPLC.
- Identificar e quantificar os iso- α -ácido do lúpulo ao longo da fervura por HPLC e descrever seu perfil matemático.
- Quantificar e acompanhar o desempenho do teor alcoólico e extrato ao longo das etapas de fermentação e maturação através de análise desenvolvida no equipamento *Beer Analyser*
- Quantificar e analisar compostos de amargor ao longo da fermentação e maturação da cerveja.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Sabores e Aromas da Cerveja

Apesar da produção de cerveja ser milenar, data-se a sua origem por volta de 4000 anos a.C. O aprimoramento das técnicas de produção cervejeira ocorreu apenas com os germânicos (1500 a.C.). Nesta época, o império romano tomou o vinho como bebida sagrada, enquanto a cerveja era tida como a bebida dos pecadores e plebeus. Entretanto, entre os povos germânicos sua produção, especificamente para o consumo, difundiu-se. Assim, a primeira prova da existência de um cervejeiro alemão data por volta de 800 a.C. e, a partir de então as técnicas de produção e o sabor da cerveja foram aprimorados (KLING, 2006).

O sabor da cerveja germânica em questão, contudo, não se assemelhava em praticamente nada do produto que usualmente consumimos atualmente, já que naquela época ainda não havia o uso do lúpulo. Em seu lugar eram utilizadas especiarias diversas e a difusão desta técnica se deu principalmente na região sul da Germânia. Porém, algumas dessas ervas eram tóxicas ao ser humano e outras causavam alucinações. Como muitos desses efeitos não podiam ser explicados, o fracasso da utilização dessas ervas no processo cervejeiro era explicado pelo misticismo. Mais tarde, na Idade Média, denominavam esses produtores de cerveja como bruxos, o que ocasionou a perseguição deles até o ano de 1591 (KLING, 2006).

Em contrapartida, os monges procuravam alguma bebida nutritiva para consumirem ao longo da quaresma, já que líquidos eram permitidos. Assim, eles descobriram a cerveja, a qual denominavam “pão líquido” e logo se tornaram não apenas consumidores, mas também produtores de cerveja. Eles então tinham suas próprias receitas e as aprimoravam e testavam novos ingredientes em seus mosteiros, o que resultou na descoberta do lúpulo como ingrediente de aroma e amargor. Isto ocorreu em um mosteiro ao redor de *Weihenstephan* cerca de 800 anos d.C. Com isso, a estabilidade da cerveja também melhorou. O sabor da cerveja, portanto, se tornou mais semelhante com o que conhecemos. Os mosteiros, então contribuíram substancialmente para o desenvolvimento do processo e dos atributos sensoriais da cerveja, popularizando seu consumo (KLING, 2006).

A cultura cervejeira que está se desenvolvendo no Brasil, por sua vez, tenta resgatar a arte desta bebida milenar, com seus diferentes buquês aromáticos e suas experiências sensoriais. Portanto, a atração do consumidor pelas cervejas especiais tem aumentado ao longo dos últimos anos devido, em especial, à diversidade de sabores e aromas advindos desse produto. Hoje em dia, no mercado nacional o consumidor possibilita harmonizar um estilo de cerveja para cada ocasião e alimento. Entretanto, tal diversidade de sabores pode ser mais encontrada no mercado

europeu, principalmente nos países como Alemanha, Bélgica e Inglaterra. Os estilos de cerveja mais consumidos e conhecidos são provindos em sua grande maioria destes países e, com isso, foram criadas escolas cervejeiras com a finalidade de caracterizar e agrupar os estilos de cervejas (KLING, 2006).

3.2. Lúpulo: componentes que afetam o sabor

O lúpulo faz parte dos ingredientes essenciais na produção de cerveja devido às suas propriedades funcionais, ou seja, desempenha papel importante no desenvolvimento do amargor e aroma da cerveja, além de reduzir riscos microbiológicos e complexar-se com proteínas. No entanto, os estilos de cerveja são divididos, principalmente, de acordo com a fermentação. Cada estilo também, pode carregar características relacionadas ao lúpulo, em especial a medida de amargor denominada IBU (*International Bitterness Unit*). A substância mais importante proveniente do lúpulo para o uso cervejeiro é a lupulina, a qual pode ser separada em resinas e óleos essenciais. Ela é encontrada nas flores femininas da espécie *Humulus lupulus* que pertence à família *Cannabaceae*. Essa espécie de planta perene é do tipo trepadeira, ou seja, necessita de algum apoio para obter crescimento (FERGUS, 2006).

O cultivo dessa planta, em geral, depende de algumas condições naturais para ocorrer, como solos profundos e férteis, verões quentes e invernos frios e grande aporte de água. Todavia, a maior razão do lúpulo ser cultivado somente em algumas regiões do planeta está relacionada com a duração da luz solar diária, ou seja, a planta necessita de um dia com mais de 13 h de luz solar para florescer. Por isso, o cultivo do lúpulo no Brasil é dificultado, já que o país não se encontra na latitude que oferece este tempo necessário de luz solar. Apesar de alguns países também não possuem essa condição, como a África do Sul, eles obtiveram sucesso na produção de lúpulo com o uso de luzes artificiais a fim de estender o tempo de exposição à luz (FERGUS, 2006).

Apesar de se cultivar basicamente uma espécie de lúpulo, há grande diferenciação deste entre suas variedades, as quais são classificadas de acordo com seu objetivo na produção da cerveja, como lúpulo de aroma, amargor e amargor e aroma (duplo propósito). A utilização do lúpulo nas cervejarias é de acordo com seus óleos essenciais e α -ácidos, isto é, com a quantidade de compostos de aroma e de amargor do lúpulo. Contudo, ainda há o surgimento de novas variedades de lúpulo através do cruzamento dentre plantas pertencentes a diferentes variedades com o objetivo de aprimorar algumas características da planta, como a quantidade de α -ácidos e óleos essenciais, maior resistência a pragas e aumentar o rendimento dos cones. O lúpulo é

utilizado na cervejaria a partir de três formas: flores desidratadas, pellets e extrato (FERGUS, 2006).

O lúpulo é um dos insumos mais caros na produção de cerveja e, por isso, a diferença de composição entre as variedades é um dos aspectos mais importantes na escolha deste insumo para a sua utilização no processo cervejeiro. A planta também oferece baixo rendimento em peso das flores, além de haver perda de cerca de 10% na produção dos pellets, o qual é a forma mais utilizada pelas cervejarias. Sendo assim, a procura por lúpulos com alto índice de amargor e importantes compostos aromáticos é relativamente alta, o que torna importante a diferenciação dos tipos de lúpulo em amargor, aroma ou duplo propósito (KUNZE, 2011).

Os lúpulos de aroma carregam agradáveis compostos que dão características sensoriais singulares às cervejas, possuindo compostos aromáticos finos, como cariofileno e farneseno, os quais conferem aromas diferenciados às cervejas. Entretanto, lúpulos de aroma apresentam baixa quantidade de α -ácidos, de 2,4 a 5%, o que eleva o valor do produto. Então, em lúpulos de aroma os óleos essenciais são muito importantes, uma vez que estes possuem alta complexidade com mais de 300 componentes aromáticos. Os óleos essenciais são compostos em sua maioria por hidrocarbonetos, sendo a maioria terpenos, salvo algumas exceções. Para se caracterizar os componentes dos óleos essenciais é empregada análise por cromatografia gasosa dos seus óleos essenciais (FERGUS, 2006; BAHMFORT, 2009; KUNZE, 2011).

Por outro lado, lúpulos de amargor apresentam alto índice de α -ácidos entre 10 a 15%. Um lúpulo de amargor dito de alta qualidade contém menos que 25% de cohumulona, assim, a qualidade do lúpulo está relacionada não somente com a variedade, como com o cultivo, visto que é diretamente dependente das condições climáticas durante o ano. Todavia, em todas as variedades encontra-se a resina, da qual são extraídos os ácidos importantes para o amargor, principalmente o α -ácido e o β -ácido. Nos α -ácidos podem ser encontrados três compostos majoritários: cohumulona, humulona e adhumulona. Enquanto que nos β -ácidos os três compostos mais comuns são colupulona, lupulona e adlupulona. Embora a proporção dentre estas formas seja variável, a proporção de adhumulona nos α -ácidos é sempre inferior que as demais, do mesmo modo que a adlupulona é a menor porção dos β -ácidos (FERGUS, 2006; KUNZE, 2011).

A adição do lúpulo no processo cervejeiro se dá geralmente durante a fervura do mosto, diferenciando o tempo de adição dependendo das características desejadas na cerveja. Ou seja, os lúpulos aromáticos são colocados normalmente no final da fervura, pois os óleos essenciais são voláteis, assim, evita-se grandes perdas destes compostos. Os lúpulos de amargor,

entretanto, necessitam de isomerização para o desenvolvimento das formas isomerizadas dos compostos de amargor. E com isso aumentar sua solubilidade. A isomerização resulta nas formas análogas dos iso- α -ácidos, como isocohumulona, isohumulona e isoadhumulona (FERGUS, 2006; KUNZE, 2009).

3.2.1. Ácidos Amargos

Os ácidos amargos presentes no lúpulo estão nas resinas presentes nas flores do lúpulo, sendo que o total de resinas representa a soma de todas as frações amargas e pode ser dividida em resinas duras e macias. Nas resinas macias estão presentes os ácidos amargos mais desejados do lúpulo, os α -ácidos, que está em uma proporção entre 3-17% e os β -ácido, os quais estão em menor proporção 3-7%. Os ácidos amargos em seu estado nativo estão nas glândulas de lupulina. Nesta forma, eles são insolúveis em água, mas se dissolvem facilmente em solventes apolares, como tolueno (DE KEUKELEIRC, 2000) (HARDWICK, 1994) (KROTTENTHALER, 2009).

Estes componentes contribuem positivamente para o amargor da cerveja, já que após sua isomerização, formam a principal classe de compostos para o amargor. A cerveja adicionada de lúpulo possui um amargor agradável o qual demarca algumas características intrínsecas de certas cervejas. Entretanto, estes compostos não têm apenas a influência sensorial na cerveja, como também um efeito antibacteriano, principalmente, sobre bactérias gram-positivas, auxiliando na preservação do produto. O mecanismo de ação microbiano é atribuído à interferência do grupo prenil, característico das cadeias laterais dos β -ácidos do lúpulo, com a membrana plasmática da célula dos microrganismos. Além disso, os ácidos amargos ajudam na estabilização da espuma da cerveja, o que foi observado pela presença dos iso- α -ácidos. Estes, por sua vez, se ligam às proteínas localizadas na parede das bolhas presentes na espuma (DE KEUKELEIRC, 2000) (KROTTENTHALER, 2009).

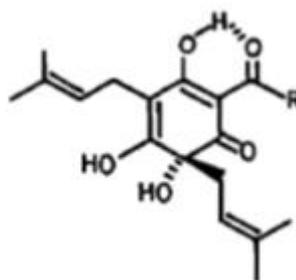
α -ácidos

Os α -ácidos são os constituintes mais importantes do lúpulo e, por isso, os mais conhecidos. São definidos quimicamente como os componentes que são precipitados quando se adiciona acetato de chumbo, formando sais de chumbo com cor amarelada. Isto ocorre, pois, a função álcool terciária presente na estrutura molecular dos α -ácidos forma um complexo com o chumbo, o que não ocorre com as moléculas de β -ácidos. Estes ácidos são compostos por uma mistura de diversas moléculas homólogas e análogas, as quais se diferem pela cadeia lateral como representado pela Figura 1. O componente principal, denominado humulona, foi a primeira fração a ser obtida na forma cristalina e caracterizada por Lintner e Schnell em 1904.

Além da humulona, os α -ácidos são compostos por mais quatro moléculas homólogas, co-, ad-, pre- e posthumulona (Figura 1) (VERZELE; KEUKELEIRE, 1991) (STEVENS, 1966).

Figura 1 - Estrutura do alfa-ácido

Humulona	$-\text{CH}_2\overset{\text{R}}{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$
Cohumulona	$-\overset{\text{R}}{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$
Adhumulona	$-\overset{\text{R}}{\text{CH}}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_3$
Prehumulona	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\overset{\text{R}}{\text{CH}}(\text{CH}_3)_2$
Posthumulona	$-\text{CH}_2\text{CH}_3$



Fonte: VERZELE et. al., 1991

A quantificação e caracterização dos α -ácidos é feita por análises por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), identificando assim, os diferentes componentes presentes nesta fração dos ácidos amargos. Ou seja, a maior porção é composta pelas humulonas (30-70%), seguida pelas cohumulonas (20-55%), adhumulona (10-15%), prehumulona (1-10%) e posthumulona (1-5%). Contudo, a proporção de humulonas e cohumulonas são dependentes diretamente da variedade de lúpulo (HARDWICK, 1994) (VERZELE, 1986).

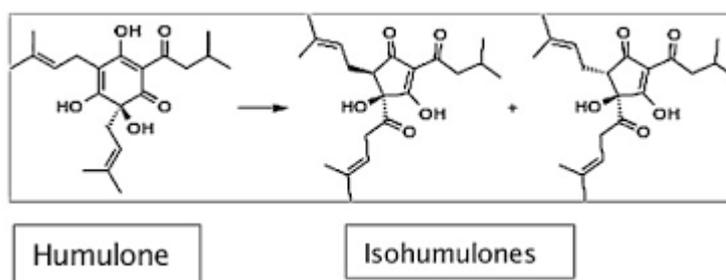
As humulonas são solúveis em todos os solventes orgânicos, são oticamente ativas, ácidas (pKa 5,4) e possuem um amargor fraco. Por outro lado, as cohumulonas são a fração mais relevante na escolha de uma variedade de lúpulo pelos cervejeiros, já que ela é associada a uma baixa qualidade de amargor, com um amargor mais áspero em comparação com os outros homólogos. Portanto, uma medida utilizada no lúpulo é a taxa de cohumulona, a qual é calculada pela equação 1. (DE KEUKELEIRC, 2000)(HARDWICK, 1994) (VERZELE, 1986).

$$\text{Cohumulona ratio (CoH ratio)} = \frac{\% \text{ cohumulona}}{\% \alpha\text{-ácidos totais}} \quad (1)$$

Todavia, os α -ácidos não são diretamente transferidos para a cerveja, devido a sua baixa solubilidade em soluções aquosas, sendo então isomerizados através da fervura do mosto em compostos denominados iso- α -ácido, os quais são mais solúveis no mosto e consideravelmente

mais amargos. A isomerização térmica é a reação mais importante para os ácidos amargos do lúpulo e ocorre via uma contração do anel acilado (figura 2). Cada humulona dá origem a duas moléculas epiméricas de isohumulona, as quais podem ter forma espacial *cis*-isohumulona ou *trans*-isohumulona, dependendo do arranjo espacial da função álcool terciário C (4) e a cadeia lateral prenil localizada no C (5). As taxas de isohumulonas dependem das condições de reação, sendo normalmente no mosto de 68:32 a favor dos compostos *cis*. (DE KEUKELEIRC, 2000) (VERZELE, 1986).

Figura 2 - Isomerização de humulona em isohumulona



Fonte: BLAND et. al., 2015

Os compostos isoméricos são mais amargos que os compostos não isomerizados, tendo um amargor equivalente a quinina, o composto tomado como referência para amargor, com limite de percepção em água de 6 ppm. Por isso, a fração mais importante para a característica de amargor da cerveja são os iso- α -ácidos, apesar do amargor real percebido pelos consumidores ser modificado pela complexação destes compostos com o açúcar residual presente na cerveja, resultando em um amargor mais agradável sensorialmente. (DE KEUKELEIRC, 2000)

β -ácidos

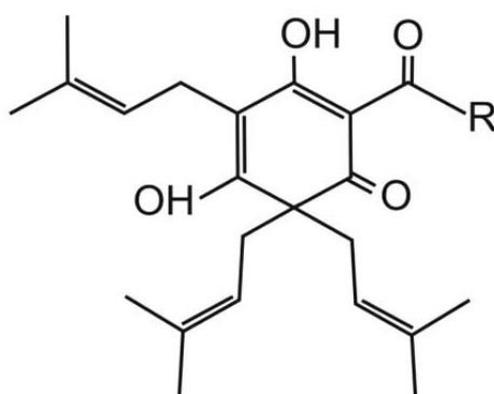
Os β -ácidos tem um valor menor na aplicação do processo cervejeiro, contudo, possuem uma alta atividade antimicrobiana devido à presença de três grupos isoprenil. Essa bioatividade é importante para a morte dos microrganismos na estocagem da cerveja. Além do mais, estes compostos são sensíveis a oxidação, podendo atuar como agente antioxidante na cerveja. Entretanto, os produtos da oxidação dos β -ácidos são indesejáveis no produto final, sendo o principal motivo das cervejarias preferirem variedades de lúpulo com menor teores desses compostos. Com isso, um importante parâmetro para saber o estado de maturação da flor de lúpulo, e também, a classificação das variedades de lúpulo é a relação entre o teor de α -ácidos e β -ácidos, denominado α : β *ratio* e representado pela equação 2. O *ratio* entre esses dois ácidos varia entre 1 e 4 e aumenta de acordo com o crescimento da planta, sendo que os lúpulos

denominados de maior qualidade possuem quantidades iguais desses compostos (BOULTON, 2013) (DE KEUKELEIRC, 2000).

$$\alpha: \beta \text{ ratio} = \frac{\% \alpha\text{-ácidos totais}}{\% \beta\text{-ácidos totais}} \quad (2)$$

Uma pequena fração da resina macia é representada pelos β -ácidos, os quais são compostos cristalinos e sem cor, que tem como principal componente as lupulonas. A separação destes da resina é mais difícil que a fração de α -ácidos, sendo necessária a cristalização repetida do β -ácido. Ele é composto por cinco moléculas homólogas denominadas lupulona (30-55%), colupulona (20-55%), adlupulona (5-10%), prelupulona (1-3%) e postlupulona (teor desconhecido), onde se diferenciam pela cadeia lateral. A figura 3 representa as três formas mais comuns dos componentes dos β -ácidos (VERZELE, 1986).

Figura 3 - Estrutura dos componentes dos beta-ácidos



R = -CH(CH₃)₂ **Colupulona**

R = -CH₂CH(CH₃)₂ **n-Lupulona**

R = -CH(CH₃)CH₂CH₃ **Adlupulona**

Fonte: SAUGSPIER et. al., 2012

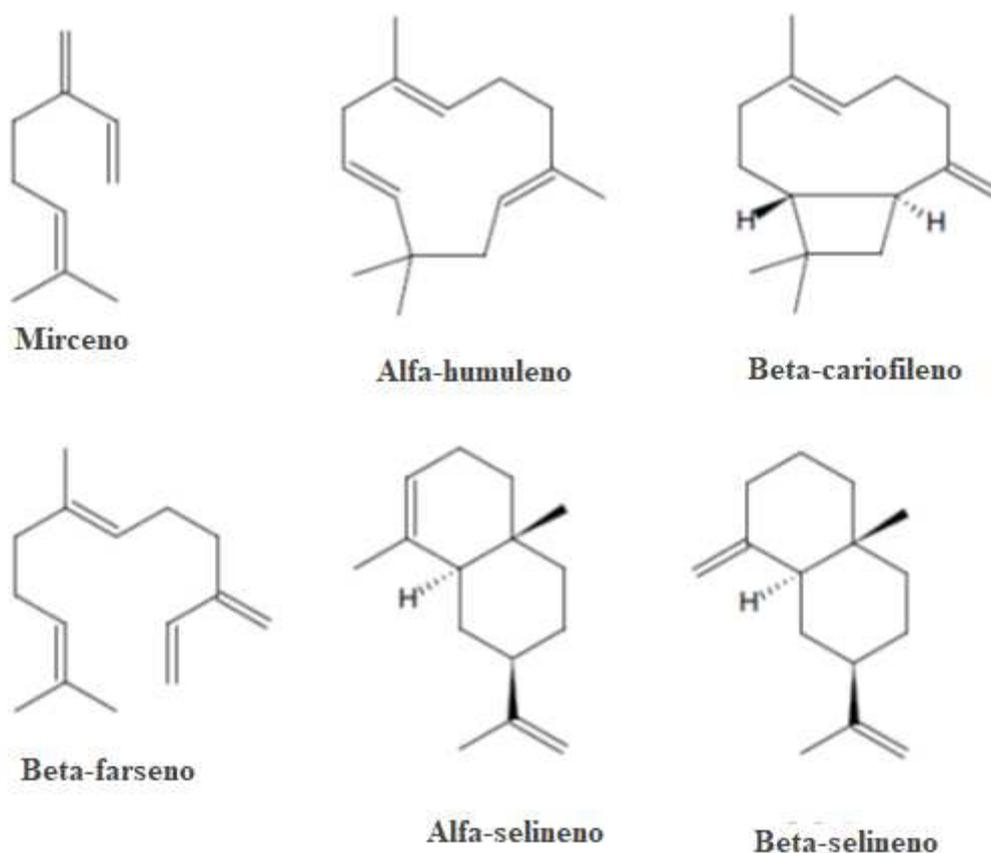
A solubilidade do β -ácido é baixa em água, sendo que as propriedades do mosto não favorecem a sua solubilidade e como consequência, somente traços são encontrados na cerveja.

Ao contrário dos α -ácidos, eles não sofrem isomerização ao longo da fervura do mosto, portanto, eles não contribuem para o amargor final da cerveja (ALMAGUER et al., 2014).

3.2.2. Óleos Essenciais

Alguns compostos de aroma presentes na cerveja são provenientes do lúpulo, já que assim como toda planta, ele possui compostos voláteis que promovem seu aroma característico. Óleo essencial é definido como a fração volátil do lúpulo e faz parte do metabolismo secundário da planta. O lúpulo possui de 0,5-3% de óleos essenciais nos cones secos, os quais podem possuir entre 0,4 a 2,5 mL/100g de óleo essencial dependendo da variedade do lúpulo. Os componentes majoritários deste são os hidrocarbonetos terpenos, dentre estes os compostos mais importantes para o aroma são o mirceno, humuleno e cariofileno (figura 4), os quais representam juntos cerca de 80% do total dos óleos essenciais (ALMAGUER et al., 2014) (HARDWICK, 1994) (VERZELE, 1986).

Figura 4 - Terpenos majoritários dos óleos essenciais



Fonte: HARDWICK, 1994

O buquê aromático proveniente do lúpulo é composto essencialmente pelos hidrocarbonetos e compostos oxidados destes. Os hidrocarbonetos, por sua vez, podem ser classificados em três grupos, como os hidrocarbonos alifáticos, monoterpenos e sesquiterpenos, sendo muito voláteis e muito susceptíveis à oxidação e polimerização. A solubilidade dos hidrocarbonetos em água, mosto ou na cerveja é muito baixa, embora possuam um alto limite de detecção sensorial. Além disso, eles são em sua maior parte perdidos ao longo da etapa de fervura do processo, ou posteriormente, ao longo da fermentação e são encontrados somente traços destes compostos no produto final (ALMAGUER et al., 2014) (HARDWICK, 1994) .

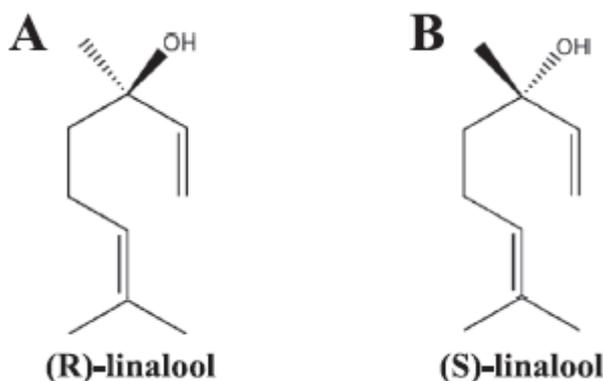
O monoterpeno mirceno é o mais importante quantitativamente dentre os terpenos, já que ele representa de 17-37% do total dos óleos essenciais, tornando-se o responsável pelo aroma típico de lúpulo fresco, que pode ser percebido na cerveja (KROTTENTHALER, 2009) (SHARP; COLLIER, 2016).

O grupo dos sesquiterpenos compõem, principalmente, os compostos α -humuleno, β -carofileno e β -farseno, e possuem um ponto de ebulição maior que os monoterpenos. O α -humuleno é o sesquiterpeno mais abundante no lúpulo e foi um dos primeiros compostos a ser identificado no óleo essencial. Enquanto o β -carofileno é o segundo sesquiterpeno mais importante do lúpulo, o qual junto com o α -humuleno contribui positivamente para o aroma do lúpulo, sendo desejado em uma proporção de 3:1 (α -humuleno: β -carofileno) para oferecer um aroma de caráter mais nobre com notas herbais, florais e de especiarias. O sesquiterpeno β -farseno comumente se encontra no lúpulo da variedade Saaz, o qual é amplamente utilizado em cervejas do estilo Bohemian Pilsner e pode ser encontrado numa concentração de até 30% do total do óleo essencial (ALMAGUER et al., 2014) (HARDWICK, 1994) (KROTTENTHALER, 2009).

Outro grupo de compostos encontrado nos óleos essenciais são os hidrocarbonetos oxigenados, que representam uma fração de até 30% do total dos óleos essenciais e sua composição pode ser mais complexa que os hidrocarbonetos. A fração total dos compostos oxigenados é constituída por uma mistura complexa de álcoois, aldeídos, ácidos cetonas, epóxidos e ésteres. No entanto, somente uma pequena parte dos componentes oxigenados dos óleos essenciais ainda permanecem na cerveja, embora contribuam de forma significativa para o sabor da bebida. Estes compostos possuem um limite de detecção baixo, medidos em partes por bilhão (ppb) ao invés de partes por milhão (ppm). (ALMAGUER et al., 2014) (HARDWICK, 1994).

Um dos compostos oxigenados de maior interesse no lúpulo é o linalool, o álcool terpênico encontrado no lúpulo, e considerado uma substância importante como indicador da qualidade do aroma da cerveja. O linalool constitui-se a partir da hidratação do β -mirceno e também um composto quiral, o qual é encontrado em duas diferentes formas enantiômeras, representadas pelas formas (R)-(-)-Linalool e (D)-(+)-Linalool (figura 5). No entanto, a forma (R)-linalool é mais ativa sensorialmente e está presente no óleo essencial normalmente em proporções menores que 1%. Este composto é responsável pelo aroma de caráter floral na cerveja e possui um limite de detecção por volta de 6 ppb em água e 10 ppb na cerveja. (ALMAGUER et al., 2014) (HARDWICK, 1994).

Figura 5 - Estereoisômeros do linalool



Fonte: ALMAGUER et al., 2014

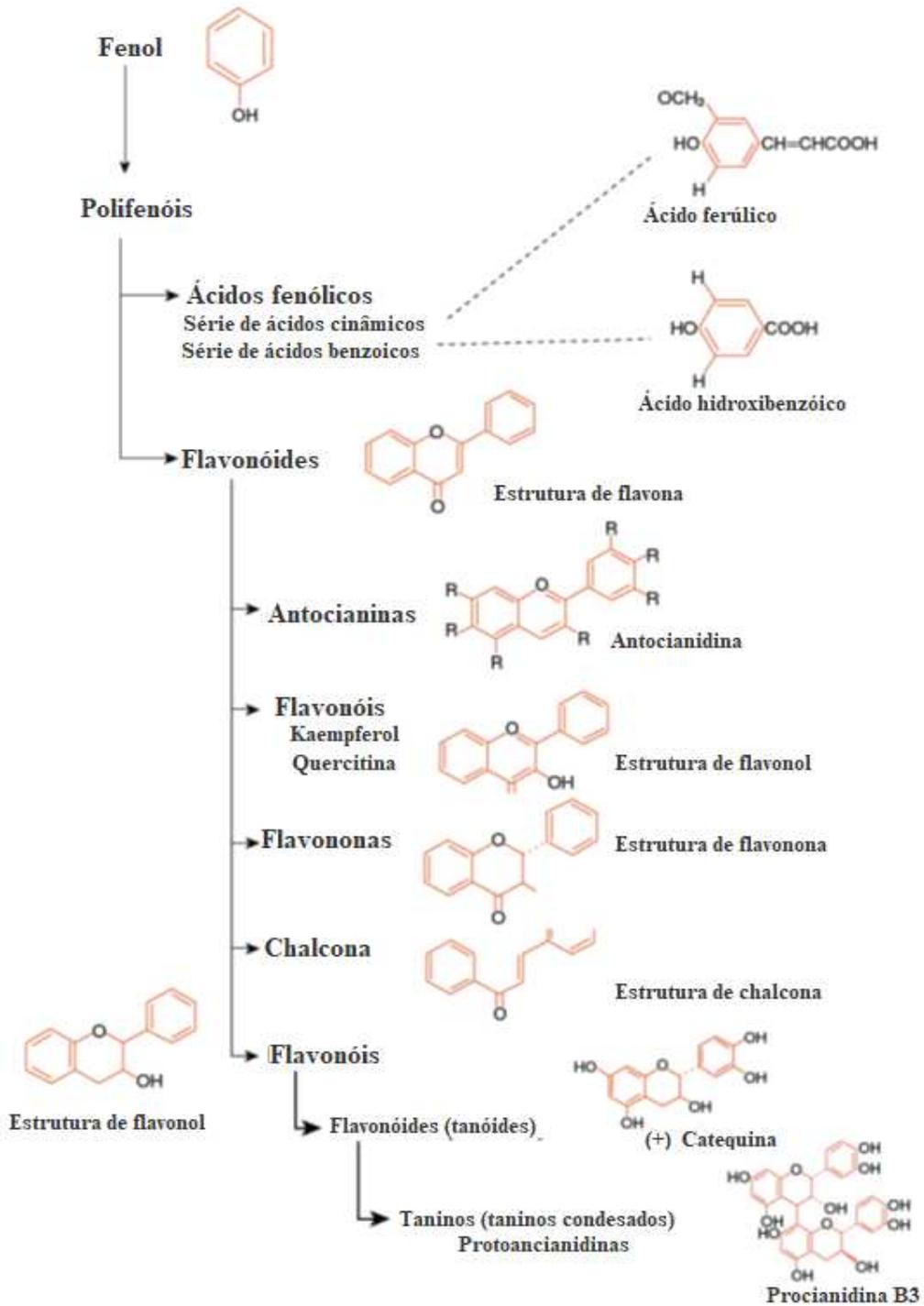
3.2.3. Polifenóis

Os polifenóis são compostos orgânicos aromáticos que possuem um ou mais átomos de carbono no anel aromático é ligado a um grupo hidroxil, ou seja, eles são derivados de compostos benzênicos monohidroxilados. Os polifenóis contêm dois ou mais grupos fenólicos ligados (figura 6) e contribuem para o sabor da cerveja proporcionando adstringência. Os polifenóis oxidados contribuem para a cor da cerveja, além de promover a estabilidade coloidal da espuma através da complexação com proteínas. Esses compostos também possuem ação antioxidante, o que auxilia na manutenção das características sensoriais do produto final, sendo também importantes para a saúde (BOULTON, 2013).

Os polifenóis fazem parte do metabolismo secundário da planta e representam cerca de 4% do peso seco do cone de lúpulo, eles são encontrados nas pétalas e, com exceção do composto xantohumulol, não são encontrados nas glândulas de lupulina. A composição de polifenol do lúpulo, depende da variedade, área de cultivo e estado de maturação da planta. Em cones de

lúpulo com estado de maturação mais avançado, apresentam maior teor de polifenóis em comparação com o lúpulo fresco. Dentre os polifenóis presentes no mosto, cerca de 20 a 30% provém do lúpulo e o restante advém do malte. Aproximadamente 80% dos polifenóis consiste em compostos condensáveis e o restante representa os compostos hidrolisáveis. Os compostos condensáveis são os polifenóis monoméricos com seus glicosídeos, os quais têm a capacidade de se polimerizar e formar moléculas de alto peso molecular (ALMAGUER et al., 2014) (KROTTENTHALER, 2009).

Figura 6 - Estrutura dos principais polifenóis para a produção de cerveja



Fonte: BOULTON, 2013

O mosto pode conter tanto os polifenóis simples ou monoméricos quanto os polimerizados. Os primeiros podem ser representados pelos ácidos monofenólicos de dois grupos, seus grupos formadores incluem o ácido gálico, ácido protocatecúico, ácido vanílico, ácido cafeico, dentre outros. Na cerveja, eles promovem sensações sensoriais, como adstringência e amargor dependendo do grau de polimerização. Em meio aquoso foi percebido que quanto maior o grau de polimerização, maior é a adstringência. Outra percepção acontece de acordo com o tamanho molecular, pois os monômeros são consideravelmente mais importantes para o amargor que os dímeros, os quais são mais importantes que os trímeros. O amargor produzido pelos polifenóis interage com o amargor proveniente dos iso- α -ácidos, já que cervejas com baixos níveis de polifenóis possuem a qualidade e intensidade de amargor semelhante aquele provindo dos iso- α -ácidos. Já em altos níveis de polifenóis, o amargor é considerado com caráter medicinal e metálico (ALMAGUER et al., 2014) (BOULTON, 2013).

3.3. Relação dos sabores com estilos

A palavra estilo pode ser definida como uma forma ou técnica particular pela qual algo é realizado, resultando em produtos diferenciados. Os sabores da cerveja, por sua vez, são importantes para demarcar suas características quanto ao tipo ou estilo. Tais características sensoriais podem se alterar dependendo do país ou região na qual a cerveja é produzida, incrementando-se alguns elementos relacionados com os ingredientes ou processo de fabricação. Contudo, a expectativa do consumidor deve sempre ser levada em consideração ao elaborar uma cerveja de determinado estilo (KUNZE, 2011).

O estilo da cerveja tem em sua criação a origem em determinadas regiões com proximidades geográficas, compartilhando certos atributos. Estes incluem o corpo da cerveja, o teor alcoólico, amargor, cor e perfil aromático. Entretanto, as características de determinado estilo podem variar de cervejeiro para cervejeiro, embora ainda mantenham a formulação que as distinguem dos demais estilos. Outro fator importante para a composição do estilo são os ingredientes, que podem alterar suas propriedades sensoriais de acordo com a região que é produzido, influenciando assim o perfil sensorial dos estilos (DANIELS, 1996).

O sabor é um importante fator para a determinação de um estilo, sendo também, composto pelo aroma e gosto, expressando-se diferentemente em cada estilo de cerveja, e o retro gosto que representa essencialmente o amargor da cerveja. O limiar do sabor pode ser entendido como o valor percebido dos compostos proveniente do produto. Além disso, cada tipo de cerveja pode ser definido também por características físico-químicas, como gravidade

específica, cor e amargor, que são medidos ao longo do processo e no produto final (DANIELS, 1996; KUNZE, 2011).

A cerveja consiste em um produto com grande complexidade em seu buquê aromático, o que a torna um produto muito desejado, assim como o vinho. Contudo, seus aromas advêm de complexas reações que ocorrem durante o processamento ou especificamente de determinado ingrediente, como os óleos aromáticos do lúpulo. Além disso, uma etapa importante para o desenvolvimento do aroma da cerveja é a fermentação, porquanto as leveduras produzem diversos subprodutos de aroma, os quais se diferenciam de acordo com a cepa utilizada. As leveduras também podem se diferenciar quanto ao tipo de fermentação, as quais podem ser de baixa (*Lager*) ou alta fermentação (*Ale*) (KUNZE, 2011).

Os compostos de aroma produzidos pelas leveduras compõem o buquê aromático da cerveja, em especial os álcoois de alto peso molecular e os ésteres. A relação entre estes dois compostos reflete o andamento da fermentação, ou seja, uma proporção alta de álcool em relação aos ésteres caracteriza uma fermentação normal. No entanto, pode ocorrer uma proporção de álcool em relação ao éster maior que o esperado, devido à alguns fatores como a intensa aeração no tanque de fermentação. Além disso, essa não é desejável, pois há perda do arredondamento das características de sabor. As leveduras de alta fermentação também podem influenciar, produzindo mais ésteres do que álcoois superiores em relação às leveduras de baixa fermentação. As temperaturas mais altas e a aplicação de pressões maiores em leveduras de alta fermentação reduzem a produção desses compostos. Em cervejas mais fortes, como *bockbier* e *festbier*, são esperadas notas de ésteres e um sabor mais arredondado, enquanto que em cervejas *Lagers*, em especial do estilo *Pilsner*, a expressão dos álcoois superiores é maior em relação aos ésteres (KUNZE, 2011).

O modo de classificação mais comum utilizado para diferenciar os estilos de cerveja é de acordo com o tipo de fermentação. Como já dito, há dois tipos diferentes de fermentação, a alta e a baixa fermentação, usualmente denominadas *Ale* e *Lager*, respectivamente. Assim, se divide os estilos de cerveja em dois grandes grupos, os quais levam o mesmo nome do tipo de fermentação, além de possuir diferenças de processo dentre eles. Em relação às escolas cervejeiras, há certas preferências por cada tipo de fermentação, ou seja, as cervejas da escola inglesa, por exemplo, são em sua maioria *Ale*, enquanto a escola alemã tem preferência pela baixa fermentação (KLING, 2006; KUNZE, 2011).

O tipo de fermentação é outro fator que influencia nas diferenças sensoriais entre os estilos de cerveja. Sendo assim, as leveduras de alta fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*)

produzem um aroma mais frutado, aromático e picante, enquanto as leveduras de baixa fermentação (*Saccharomyces carlsbergensis*) produzem um buquê aromático mais leve, menos florado, mais suave. As diferenças também são percebidas durante o processo de fermentação, no qual as leveduras de alta fermentação trabalham a uma temperatura entre 18 e 23 °C por cerca de 2 a 4 dias de fermentação, ao passo que, as de baixa fermentação necessitam de temperaturas mais baixas, por volta de 7 a 12 °C e o tempo de fermentação é mais elevado, durando cerca de 6 a 10 dias (KLING, 2006).

A primeira menção da alta fermentação foi no final do séc. XV, ganhando maior importância na segunda metade do séc. XIX. A diferenciação entre as cervejas produzidas por alta ou baixa fermentação vai além da espécie de levedura utilizada, visto que são produzidos diferentes produtos provindos do metabolismo destas, compondo as características intrínsecas de cada estilo produzido. As leveduras de alta fermentação utilizam somente um terço dos açúcares fermentescíveis, enquanto as de baixa fermentação utilizam todo o aporte desses açúcares. No entanto, as primeiras produzem maior quantidade de subprodutos durante a fermentação, como álcoois superiores e ésteres, em especial, etilacetato e isoamilacetato. Os estilos de cerveja mais conhecidos produzidos a partir de alta fermentação são *Weizenbier*, *Berliner Weiße*, *Altbier* ou *Kölsch*, sendo estes caracteristicamente alemães. Os estilos ingleses são representados pelas *Ale* (por exemplo, *Pale Ale*), *Porter* e *Stout*, já os estilos belgas são as *Lambic*, *Gueuze*, *Trapistas* e *Witbier* (KUNZE, 2011).

Por outro lado, as cervejas de baixa fermentação só foram possíveis industrialmente com o advento de máquinas de refrigeração (1871) devido à dependência deste processo na fermentação a baixas temperaturas. Este grupo de cervejas, até o fim do séc. XIX era o tipo de produção quase exclusivo das cervejas provenientes da Bavária. As cervejas produzidas nesta época eram em sua maioria escuras e menos lupuladas. Houve, porém, uma mudança posterior com o surgimento das cervejas claras e mais leves, como a cerveja *Pilsen*, que tem origem na cervejaria *Urquell* situada na cidade de Pilsen na República Tcheca. Sendo assim, os estilos que mais representam este grupo, além do já citado tipo *Pilsner* e suas variações, são a *Bockbier* e *Doppelbock*, originários na Alemanha (FERGUS, 2006; KUNZE, 2011).

3.4. Importância do lúpulo brasileiro

A cerveja define-se pelo art. 36 do [Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009](#), o qual diz que ‘a cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo’. Ou seja, para um produto ser denominado cerveja de acordo com a legislação brasileira, deve conter lúpulo adicionado. O lúpulo utilizado atualmente no Brasil é totalmente importado, principalmente dos EUA e Alemanha, o que aumenta, substancialmente, seu preço. Na tabela 1 é apresentado o preço do lúpulo em três diferentes lojas de insumos em comparação com o preço do malte por kg. Ao observar a relação de preço entre estes dois insumos pode-se perceber que o preço do lúpulo é em média 27 vezes maior que o do malte, o que demonstra o quão oneroso é o preço do lúpulo para a produção de cerveja, sendo que uma parte deste resulta das taxas de importação (BRASIL, 2009).

Tabela 1 - Preço do lúpulo em comparação com preço do malte

LOJA	Preço lúpulo (R\$/kg)	Preço malte (R\$/kg)
Lamas Brew Shop	188 ¹	8,7 ²
Homebrewers	280 ³	10 ⁴
Casa Olec	238 ⁵	6,98 ⁶

Além disso, os lúpulos disponíveis no mercado brasileiro são de safras com no mínimo dois anos, o que pode gerar consideráveis perdas dos compostos desejáveis para o processo cervejeiro. Durante o armazenamento do lúpulo há a oxidação dos compostos das resinas macias. Os lúpulos estocados à temperatura ambiente por dois anos podem ter uma perda de 15 – 20% do total de α -ácidos, o que reduz seu potencial de utilização. Os compostos oxidados a partir dos ácidos podem ainda conferir gosto amargo ao produto final. Porém, este amargor é indesejável pelo consumidor, classificado como amargor medicinal. Em relação ao aroma, lúpulos estocados por muito tempo podem desenvolver aroma de queijo, por causa da presença

¹ Disponível em: <http://loja.lamasbrewshop.com.br/insumos/lupulos/lupulos-de-aroma/lupulo-Cascade.html> acesso em: 29 dez. 2017

² Disponível em: <http://loja.lamasbrewshop.com.br/insumos/malte-cereais/malte-base/malte-pale-ale-the-swaen-importado-holanda-lamas.html> acesso em: 29 dez. 2017

³ Disponível em: <http://www.homebrewers.com.br/lupulo/46-lupulo-Cascade.html> acesso em: 29 dez. 2017

⁴ Disponível em: <http://www.homebrewers.com.br/the-swaen/167-pale-ale-the-swaen.html> acesso em: 29 dez. 2017

⁵ Disponível em: <http://casaolec.com.br/insumos/lupulos/lupulo-Cascade-2015-50g-1523/p> acesso em: 29 dez. 2017

⁶ Disponível em: <http://casaolec.com.br/insumos/maltes/malte-pale-ale-agraria/p> acesso em: 29 dez. 2017

de ácido isovalérico, isobutírico e 2-metilbutírico. Os cones frescos possuem de 1 – 3% desses ácidos voláteis, enquanto aqueles estocados por três anos podem conter até 20% (BRIGGS et al., 2004).

A produção de lúpulo no Brasil, por sua vez, promove ganhos para os produtores, gerando maior renda e empregos. Ademais, há ganhos também para a indústria cervejeira, visto ter um insumo com maior qualidade sensorial e menor valor agregado, já que não haverá a taxa de importação embutida no preço. O plantio de lúpulo no Brasil possibilitará a criação de um produto com identidade nacional, podendo no futuro contribuir para a criação de uma escola cervejeira brasileira, com cervejas de caráter nacional, produzida com insumos brasileiros.

3.5. Processamento da cerveja

3.5.1. Mostura

A brasagem é a etapa que é produzido o mosto composto de açúcares redutores que serão utilizados pelas leveduras em seu metabolismo durante a fermentação. Esta etapa se inicia com a mistura do malte moído com água, denominada mosto. A mistura é feita em um tanque, o qual sofre aquecimento brando com a finalidade de atingir a faixa de temperatura de atuação das enzimas presentes no malte para a hidrólise dos componentes deste (LEWIS, 1995) (HARDWICK, 1994).

As enzimas mais importantes para a hidrólise do açúcar são a α -amilase e β -amilase, as quais promovem a sacarificação do amido presente no malte. A α -amilase é uma endo-enzima que atua na ligação α -1-4 do amido de forma randômica, o que pode gerar açúcares fermentescíveis como glicose, maltose e maltotriose e também moléculas maiores e não fermentescíveis, como as dextrinas. Enquanto isso, a β -amilase é uma exo-enzima que atua especificamente nas ligações α -1-4 do amido, produzindo a maltose que é um dissacarídeo fermentescível. As α -amilases atuam em faixas mais altas de temperaturas, com sua temperatura ótima por volta de 70 °C, enquanto as β -amilases atuam melhor em temperaturas mais baixas, numa faixa entre 55-60 °C (LEWIS, 1995).

Após a sacarificação do mosto, é realizado o mash out que é um aquecimento do mosto a temperatura cerca de 78 °C com a finalidade de inativar as enzimas presentes no mosto. A próxima etapa é denominada filtração, na qual o mosto é transferido para uma tina de filtração com fundo falso onde serão separados o mosto do bagaço de malte. Este bagaço é lavado com água aquecida para se obter maior rendimento da extração de açúcares do malte. Depois de filtrado, o mosto é transferido para o tanque de fervura (HORNSEY, 1999) (LEWIS, 1995).

3.5.2. Fervura

Esta etapa do processo ocorre após a filtragem do mosto, e é na fervura que ocorre o maior gasto energético do processo com um consumo de cerca de 18% do total de energia do processo. A fervura é uma etapa importante do processamento de cerveja, pois nela ocorrem importantes alterações no mosto, como a extração e formação de componentes do mosto, formação e precipitação dos complexos de proteína e polifenóis, evaporação da água, esterilização do mosto, desnaturação de todas as enzimas, modificação da coloração do mosto, acidificação do mosto e evaporação do dimetilsulfeto (DMS) (HARDWICK, 1994) (KUNZE, 2011).

Dentre todos os objetivos desta etapa, a adição do lúpulo é um dos mais importantes, já que é nesta etapa que o lúpulo é adicionado. O lúpulo pode ser adicionado em vários momentos durante a fervura a fim de promover a formação de aroma e sabor. A adição de lúpulo é feita nesta etapa, pois se deseja que ocorra a reação de isomerização com o intuito de converter os α -ácidos em iso- α -ácidos, processo que favorece o amargor da cerveja, como mencionado no item 2.2.1. No entanto, durante esta etapa também ocorre a perda dos óleos essenciais do lúpulo que são altamente voláteis. Por isso, utiliza-se dois tipos de adição de lúpulo, uma no início da fervura, para promover isomerização dos ácidos amargos do lúpulo e outra no final para minimizar a perda dos voláteis responsáveis pelo aroma da cerveja (HARDWICK, 1994).

Os parâmetros utilizados na adição de lúpulo durante a fervura são diretamente dependentes do estilo que se deseja produzir, além da prática desejada pela cervejaria. A adição no processamento, pode ser realizada ainda durante o pré-aquecimento do mosto, visando promover maior nível de isomerização dos α -ácidos. Sendo assim, para a produção de cervejas com menor teor de amargor e maior quantidade de voláteis desejados, o lúpulo é usualmente adicionado no final da fervura por no máximo 20 minutos. O procedimento mais usual é realizar a adição em duas partes, com uma certa quantidade de lúpulo no início da fervura (10-20 minutos iniciais) e o restante cerca 10-30 minutos antes do término da fervura. A adição tardia do lúpulo, quando a fervura já está finalizada ou durante o *whirlpool* promove um aroma mais intenso (HARDWICK, 1994).

A reação de isomerização, por sua vez, promove maior solubilidade dos α -ácidos da resina do lúpulo, já que possuem baixa solubilidade no mosto. A formação máxima de isômeros dos α -ácidos é obtida somente com cerca de 90 minutos de fervura à 100 °C. Como descrito por Malowicki e Shellhammer (2005), a isomerização é uma reação que segue uma cinética de primeira ordem (equação 3). Conquanto, os mesmos autores relataram a relação entre a constante da taxa de isomerização k e a temperatura descrita pela equação de Arrhenius

(equação 4). Além das variáveis descritas, a reação é influenciada por alguns fatores, como a densidade do mosto e pelo teor de íons e divalentes, como cálcio e magnésio (HARDWICK, 1994).

$$\text{Ln} \frac{c}{c_{inicial}} = -kt \quad (3)$$

$$k = Ae^{\left(-\frac{Ea}{RT}\right)} \quad (4)$$

3.5.3. Fermentação

O microrganismo responsável pela fermentação do mosto e conseqüente transformação deste em cerveja são as leveduras. Elas são microrganismos eucarióticos, unicelulares, heterotróficos e anaeróbicos facultativos que se reproduzem assexuadamente durante a fermentação da cerveja. As espécies utilizadas são pertencentes ao gênero *Saccharomyces sp.*, podendo ser das espécies *S. cerevisiae* ou *S. carlsbergensis*, dependendo do tipo de fermentação desejada (WILLAERT, 2012).

As leveduras do gênero *Saccharomyces sp.* Diferenciam-se em ale ou lager, ou seja, leveduras de alta ou baixa fermentação, respectivamente. Nestes dois grupos se distinguem fisiologicamente, genomicamente e dentre suas características de fermentação. Além disso, elas podem se diferenciar significativamente de acordo com alguns parâmetros de fermentação como o comportamento de floculação, tempo de fermentação, tolerância ao estresse, capacidade de armazenar trihalose e impressão organoléptica deixada na cerveja. A característica mais utilizada na diferenciação destes dois grupos de leveduras é a capacidade de fermentação de melibiose (dissacarídeo de galactose e glicose), o qual as ales são incapazes de metabolizar. As leveduras Lagers podem hidrolisar 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactose, crescendo como colônias azuis em placas de Petri com um meio contendo um indicador, enquanto as leveduras Ales permanecerão incolores em presença do 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactose (HARDWICK, 1994) (WILLAERT, 2012).

A escolha das cepas de levedura depende do estilo da cerveja e do perfil sensorial que se deseja produzir. Com isso, as cepas de leveduras Ale são utilizadas para a produção de cervejas denominadas de alta fermentação. O termo, alta fermentação, é utilizado pelo fato de as leveduras frequentemente se acumularem acima do mosto durante a fermentação, junto com a espuma, pois elas se adsorvem às bolhas de CO₂. A temperatura usualmente utilizada para este tipo de levedura é entre 18-25 °C, resultando em uma fermentação mais rápida e em cervejas marcadas por aroma mais frutado. Por outro lado, as leveduras lager são denominadas de baixa

fermentação, sendo que têm a tendência de decantarem ao longo da fermentação. A temperatura normalmente utilizada para a fermentação com essas leveduras é entre 7 a 15°C (HARDWICK, 1994) (WILLAERT, 2012).

A produção de cerveja, por sua vez, só é completa após a etapa de fermentação, sendo esta, a mais importante, porque só há a produção de cerveja de fato após esta etapa. A fermentação implica na metabolização dos substratos, em sua maioria açúcares, em produtos, como etanol e gás carbônico, pela atividade de microrganismos. Durante este processo, há também a produção de subprodutos, os quais produzem efeito considerável no perfil aromático da cerveja. A performance da fermentação é afetada por diversos parâmetros, que devem ser controlados a fim de se obter um produto final com melhor qualidade, já que o perfil sensorial da cerveja depende diretamente do metabolismo das leveduras durante a fermentação. Os parâmetros do mosto que devem ser controlados durante o processo são o volume, a gravidade específica, temperatura, esterilidade e aeração (BOULTON; QUAIN, 2001b) (ESSLINGE, 2009) (WILLAERT, 2012).

A fermentação inicia-se a partir da adição de leveduras ao mosto frio e aerado. Com isso, as leveduras começaram a assimilar os açúcares, aminoácidos, minerais e outros nutrientes, excretando compostos como etanol, CO₂, álcoois superiores e ésteres como resultado do metabolismo celular. No entanto, grandes concentrações desses subprodutos no meio podem causar toxicidade para as células de leveduras, por isso, lhes são requeridos em concentrações razoáveis. Ao ser adicionadas ao mosto frio, as leveduras utilizam o metabolismo aeróbico para seu crescimento celular e, após o fim do aporte de oxigênio no meio, iniciam o metabolismo anaeróbico através da fermentação alcoólica (ESSLINGE, 2009) (WILLAERT, 2012).

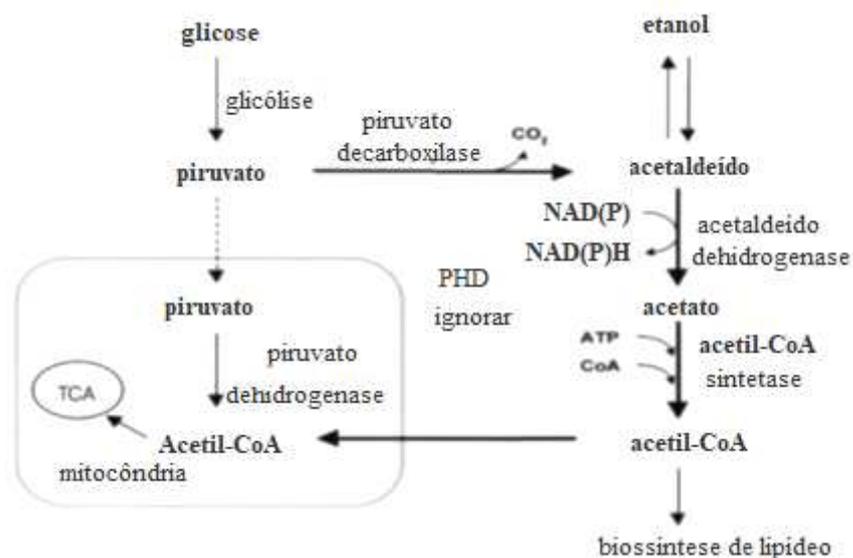
O crescimento celular das leveduras segue uma curva crescimento padrão de microrganismos, neste se divide em 4 etapas denominadas fases, que são: lag ou inicial, fase log ou exponencial, fase estacionária e fase de morte celular. A fase inicial, dura cerca de 12-24 horas e nela não são observadas diferenças na gravidade específica do mosto, contagem de células e concentração de etanol. No entanto, há decréscimo rápido da concentração de oxigênio no mosto, caindo a níveis não detectáveis após 24 h de fermentação e a concentração de aminoácidos livres decresce rapidamente com o início da fermentação, o que causa rápido declínio do pH (BOULTON; QUAIN, 2001c) (NAJAFPOUR, 2007).

Após esta fase, há o aumento da taxa de fermentação e o início da fase exponencial, na qual há declínio da gravidade específica do mosto que se acelera gradualmente até atingir seu máximo após 24-36 horas de fermentação. A queda da gravidade específica, ou extrato, é

inversamente proporcional ao acréscimo nas concentrações de etanol e biomassa de levedura. O valor mínimo da gravidade específica é encontrado após aproximadamente 100 horas, o que coincide com os valores máximos de álcool e biomassa celular. Depois deste tempo, há uma desaceleração da taxa de fermentação e a redução das células em suspensão (BOULTON; QUAIN, 2001c).

O metabolismo aeróbico das leveduras segue a rota metabólica através da produção de piruvato (figura 7), o qual é convertido em acetil-CoA pela piruvato desidrogenase. O ácido cíclico tricarboxílico, o acetil-CoA, é utilizado para a geração de energia. Como há aporte de oxigênio, o receptor de hidrogênio é o O_2 e são gerados 38 mols ATP/mol de glicose. Esta via metabólica é utilizada normalmente para o crescimento celular (BOULTON; QUAIN, 2001a).

Figura 7 - Vias metabólicas anaeróbica e anaeróbica de leveduras



Fonte: TENGE, 2009

No entanto, a via metabólica principal utilizada pelas leveduras durante a etapa de fermentação é a de origem alcoólica (figura 7), na qual há a produção de etanol a partir do consumo dos açúcares do mosto. Em geral, a fermentação alcoólica consiste na geração de energia em condições anaeróbicas, quando os açúcares redutores são metabolizados e convertidos em etanol e CO_2 , com um balanço energético de 2 mol ATP/ mol glicose. Nesta via metabólica, o receptor de hidrogênio é o acetaldeído e a glicose converte-se em piruvato. A enzima piruvato descarboxilase produz CO_2 e acetaldeído, após a enzima álcool desidrogenase transforma o aldeído em etanol (BOULTON; QUAIN, 2001a).

O perfil de consumo de carboidrato das leveduras, por sua vez, segue uma curva cinética de consumo de açúcar, a qual está relacionada com a cinética de crescimento das leveduras. A

glicose é o primeiro açúcar a ser consumido, seguido pela frutose, maltose e por fim a maltotriose. Sendo o consumo destas duas últimas inibidas ou inativadas por elevadas concentrações de glicose. Estes serão consumidos somente após no mínimo 60% da glicose disponível no mosto a ser convertido pelas leveduras. Contudo, quando há grandes quantidades de açúcares provenientes de adjuntos ou o mosto possui uma gravidade específica alta, essa repressão é mais pronunciada, resultando em atrasos na fermentação (WILLAERT, 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. caracterização da matéria prima

4.1.1. Lúpulo

Todos os experimentos foram realizados com dois lúpulos da variedade *Cascade*, porém um proveniente do EUA e outro do Brasil. O lúpulo brasileiro foi adquirido em flor diretamente com o produtor no mercado local. O lúpulo foi colhido em 2016, seco e embalado à vácuo e mantido refrigerado à -18 °C. Enquanto, o lúpulo proveniente dos EUA foi adquirido em *pellet* na loja *Lamas Brew Shop*, localizada em Campinas-SP, safra de 2016. Ele também foi mantido refrigerado à -18 °C.

4.1.2. Levedura

A levedura utilizada na etapa de fermentação do experimento também foi adquirida na loja *Lamas Brew Shop*. Utilizou-se uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* da marca Fermentis US-05. Segundo o fabricante, ela é de caráter neutro, com baixa produção de diacetil. Na tabela 2 estão descritos os parâmetros fornecidos pelo fabricante.

Tabela 2 - Levedura US-05 Fermentis

Ésteres totais	40 (ppm em mostos com GO de 18°P fermentados em tubos EBC a 20°C)
Álcoois superiores	269 (ppm em mostos com GO de 18°P fermentados em tubos EBC a 20°C)
Açúcares residuais	11 g/L
Floculação	Média
Temperatura de fermentação	12 -25 °C
% peso seco	94,0 – 96,5

4.1.3. Extrato de malte

O mosto utilizado nos experimentos foi preparado a partir de extrato de malte líquido adquirido na loja Arte Brew, Campinas-SP. O produto é da marca própria da loja e na tabela 3 estão descritos os aspectos físico-químicos fornecido pelo fabricante.

Tabela 3 - Caracterização do extrato de malte

Cinzas a 550 °C	1,39 (g/100g)
Densidade a 20 °C	1,37 (g/mL)
Brix	79,2 (°Brix)
pH (sol. 10% a 20 °C)	5,66
Acidez	13,89 (mL NaOH – 1N/ 100g)
Cor (10% - 430 nm)	38,11 (EBC)
Proteínas	4,52 (%)
Gordura total	0,1 (%)
Carboidratos total	72,89 (%)
Açúcares redutores como maltose	74,75 (%)

4.2. Análises no lúpulo

4.2.1. Determinação do teor de α - e β -ácidos

Para a caracterização do lúpulo usado no presente trabalho, foi realizada a metodologia pela American Society of Brewing Chemists (ASBC). Para isso, tomou-se uma amostra de 5g de lúpulo e triturou-se em presença de nitrogênio líquido. Esta amostra triturada foi transferida para um frasco de 125 mL para a posterior extração, adicionando-se 10 mL de metanol e 50 mL de éter dietílico. Depois, a mistura foi agitada por 30 minutos e então foram adicionados 20 mL de ácido clorídrico (0,1M), agitando-se a amostra por 10 minutos. Posteriormente, esta foi deixada em repouso com a finalidade de separar as fases para a retirada de 2,5 mL da fase sobrenadante, o éter, e depois transferida para um balão volumétrico de 25 mL, onde teve seu volume completado com metanol. Antes da análise por HPLC esta amostra preparada foi filtrada em membrana filtrante de 0,45 μ m.

A análise quantitativa levou em consideração um padrão de α -ácidos e β -ácidos que foi anteriormente preparado de acordo com as recomendações da ASBC. Para tal, adicionou-se 30 mL de metanol em cerca de 0,5 g de amostra do padrão para dissolução e depois esta mistura foi levada ao banho de ultrassom. Depois se transferiu essa mistura para um balão volumétrico de 100 mL o qual teve seu volume completado com metanol. Posteriormente, foram tomados

10 mL desta solução e pipetados em um balão volumétrico de 50 mL, completando seu volume novamente com metanol. Essa solução, foi homogeneizada e filtrada em membrana filtrante de 0,45 μm para depois ser injetada no HPLC

Determinou-se também a umidade das amostras de lúpulo, de acordo com a ASBC, pois não se tem o conhecimento do grau de secagem do lúpulo utilizada pelo produtor. Além disso, os resultados de α -ácidos e β -ácidos costumam ser expressos por grama de amostra a 10% de umidade. Para tal análise, amostras de 2,5 g de lúpulo triturado foram submetidas a secagem em estufa convencional a uma temperatura de 103 ± 2 °C por 1 h. O lúpulo foi pesado por algumas vezes até que se obter duas pesagens consecutivas com uma diferença máxima de 0,001 g.

A quantificação de humulonas foi realizada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em regime de fase reversa, com detector de UV-Vis conforme recomenda a *American Society of Brewing Chemists*. A fase móvel foi utilizada 85% metanol e 15% fase ácida (1,5 mL de ácido fosfórico 85% em 102 mL de água milli-Q) seguida de filtração e degaseficação em banho de ultrassom. A coluna cromatográfica utilizada foi Agilent eclipse XDB-C18 5 μm de tamanho de partícula 4,6 X 250 mm em temperatura de 22 °C e detector a 314 nm. O volume de injeção utilizado foi de 20 μL . A identificação dos compostos cohumolona, n + adhumolona, colupulona e n + adlupulona foi feita pela co-injeção com os padrões autênticos e sua quantificação feita pela base das áreas obtidas. As análises foram realizadas em triplicata.

4.2.2. Determinação do teor de óleos essenciais

O teor de óleos essenciais foi determinado seguindo o protocolo de análise recomendado pela ASBC. Primeiramente, fez-se uma extração dos óleos essenciais do lúpulo através de hidro destilação com um aparato de Clevenger modificado, onde os compostos provenientes do óleo são arrastados por vapor de água por 4 horas. A amostra foi preparada a partir de 30 g de lúpulo triturados com nitrogênio líquido e depois transferida para um balão de fundo redondo com volume de 2 litros, preenchido com água destilada até metade do seu volume.

Os principais componentes dos óleos essenciais do lúpulo foram quantificados por cromatografia gasosa, com uma amostra do óleo essencial diluída a 10% (v/v) em diclorometano. A injeção foi feita em um cromatógrafo a gás Shimadzu modelo GC-2010 (Shimadzu, Kyoto, Japão) acoplado a um detector de ionização em chama (FID). Os analitos foram separados em coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm). As condições cromatográficas utilizadas foram: injetor a 220 °C e razão de split 1:50 (1,0 min),

gás de arraste hélio a 0,6 mL/min, rampa de temperatura do forno: 50 °C (1 min), com incremento de 2 °C/min até 170 °C e 10 °C/min até 260 °C, detector a 280 °C. As análises foram realizadas em triplicata e os componentes do óleo essencial foram quantificados por % relativa.

A caracterização dos componentes do óleo essencial constitui sob as mesmas condições cromatográficas já descritas, mas o aparelho utilizado foi um GC-MS Shimadzu modelo GC-QP2010 acoplado a um espectrômetro de massas quadrupolar (Shimadzu, Kyoto, Japão) com temperatura da interface a 280 °C, fonte de ionização por elétrons a +70 eV (35-350 m/z). As análises foram realizadas em triplicata e a identificação dos compostos realizada através de comparações entre os espectros de massa obtidos a partir das amostras e os espectros da NIST 2008, obtendo-se similaridade mínima de 85%.

4.3. Análises do mosto isomerizado

4.3.1. Isomerização

A isomerização foi elaborada em três meios diferentes sendo um preparado a partir de extrato de malte diluído até atingir 8,7 °Brix e duas soluções tampão ajustadas para pH 5,2. Uma solução preparada com ácido 3,3-dimetil glutárico, seguindo a metodologia utilizada por Jaskula et.al. (2008), e outra preparada a partir de ácido cítrico e citrato de sódio, devido à disponibilidade deste material no laboratório. A princípio o objetivo de realizar a isomerização nestas duas soluções era a comparação entre os resultados para a tomada de decisão de qual seria melhor utilizar como parâmetro de densidade zero, visto que o gasto ao se utilizar o ácido 3,3-dimetil glutárico é muito maior ao se utilizar o ácido cítrico. Porém, não houve tempo hábil durante o desenvolvimento do projeto para a realização desta etapa e, portanto, para título de discussão a ser desenvolvida no item 4, serão utilizados somente os dados obtidos a partir da isomerização no mosto. Os dados obtidos com as soluções tampão estão apresentados no apêndice A.

Sendo assim, o mosto foi feito a partir de extrato de malte Pale Ale diluído com água deionizada até atingir densidade equivalente a 8,7 °Brix. Para cada ensaio foram utilizados 500 mL desse mosto em um balão de fundo redondo de 1L com duas bocas de saída, onde uma estava acoplado um condensador de vidro com água circulando a 5 °C e outra tampada com rolha e utilizada para a retirada das alíquotas (figura 8).

Figura 8 - Aparato utilizado para isomerização de lúpulo



Fonte: Autoria própria

Ao mosto fervendo foi adicionada uma quantidade determinada de lúpulo ou padrão calculada de acordo com a equação 5 e suas equações derivadas (5.1 a 5.4), descrita por Tinseth⁷, ajustada para se obter um mosto com 30 IBU. As quantidades de lúpulo ou padrão adicionadas ao mosto estão expressas na tabela 4.

$$IBU = [\alpha - \text{ácidos}_{\text{utilizada}}] * \left[\left(\frac{mg}{L} \right) \alpha - \text{ácidos}_{\text{adicionada}} \right] \quad (5)$$

Sendo

$$[\alpha - \text{ácidos}_{\text{utilizada}}] = \text{Fator}_{\text{bigness}} * \text{Fator}_{\text{tempo}_{\text{fervura}}} \quad (5.1)$$

$$\left[\left(\frac{mg}{L} \right) \alpha - \text{ácidos}_{\text{adicionada}} \right] = \frac{\text{concentração}_{\alpha - \text{ácidos}} * g_{\text{lúpulo}} * 1000}{\text{volume}_{\text{final}}(\text{litros})} \quad (5.2)$$

⁷ <http://realbeer.com/hops/> acessado em: 23 dez. 2017

$$Fator_{Bigness} = (1,65 * 0,000125^{(densidade_{original}^{-1})}) \quad (5.3)$$

$$Fator_{tempo\ fervera} = \left(\frac{1 - e^{(-0,04 * tempo_{(min)})}}{4,15} \right) \quad (5.4)$$

Tabela 4 - Quantidade utilizada de lúpulo e padrão

Tipo de lúpulo	Meio	Lúpulo (g)
Lúpulo Cascade americano	MOSTO	0,7701
Lúpulo Cascade Brasileiro I	MOSTO	0,6684
Lúpulo Cascade Brasileiro II	MOSTO	0,6648
Padrão α- e β-ácidos IECs	MOSTO	0,1480
Padrão α- e β-ácidos IECs	TAMPÃO CITRATO	0,1139
Padrão α- e β-ácidos IECs	TAMPÃO GLUTÁRICO	0,1139

Após a adição do lúpulo, o mosto foi fervido por 90 minutos e foram colhidas amostras de 5 mL em tempos determinados de 5, 10, 15, 20, 30, 45, 60 e 90 minutos após o início da fervura. As amostras colhidas foram transferidas para tubos criogênicos de 5 mL e mergulhados imediatamente em nitrogênio líquido para a interrupção da reação de isomerização. As amostras ficaram armazenadas em freezer a -18 °C até a utilização para a extração dos ácidos amargos.

Para a realização das análises de ácidos amargos, as amostras passaram por uma extração líquido-líquido. Cada amostra foi descongelada e transferida para um funil de separação de 60 mL, acidificada com 0,5 mL de solução de ácido fosfórico (12M) e então adicionada de 10 mL de isooctano. Depois foi coletada a camada sobrenadante de isooctano, transferida para balão de fundo redondo de 100 mL e então concentrada em rotavapor a 60 °C. Após a evaporação completa do isooctano, adicionou-se 1mL uma solução de etanol acidificado com ácido fosfórico (99,75/0,25; v/v). A amostra foi então transferida para um tubo criogênico de 5 mL e armazenada em freezer à -18°C.

4.3.2. Quantificação do teor de α -ácidos

A quantificação de humulonas realizou-se utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em regime de fase reversa, com detector de UV-Vis conforme recomenda a *American Society of Brewing Chemists*, como já descrito no item 4.2.1.

Para o preparo dos padrões e da curva de calibração foram pesados 0,5056 g do padrão de α - e β -ácidos ICE-3 e esta massa foi diluída quantitativamente para 100 mL de metanol. A solução obtida foi denominada de solução estoque. Para o preparo da curva de calibração 10 mL da solução estoque foram diluídos para 50 mL de metanol. Esta segunda solução denominou-se de solução de trabalho. Estas soluções foram injetadas em pentaplicata no HPLC.

4.3.3. Quantificação do teor de iso- α -ácidos

A quantificação das iso-humulonas efetuou-se utilizando cromatografia líquida de alta eficiência em regime de fase reversa, com detector de UV-Vis e comprimento de onda fixo conforme método descrito pela *American Society of Brewing*.

A fase móvel foi preparada utilizando um gradiente em regime binário iniciando a corrida com 82% de metanol e 18% de fase ácida preparada utilizando 10 mL de ácido fosfórico 85% e 1 mL de solução de EDTA 4% para cada 240 mL de água milli-Q, seguida de filtração e degaseficação em banho de ultrassom.

Gradiente de eluição: o gradiente de eluição teve início com 82% de metanol e 18% de fase ácida, por 10 minutos seguido de aumento da quantidade de metanol para 90% até 10,50 minutos, mantendo esta concentração até 19,50 minutos, alterando a composição para 82% de metanol e mantendo este gradiente até 20 minutos de corrida, encerrando a corrida cromatográfica em 32 minutos. A coluna utilizada foi eclipse XDB-C18 5 um de tamanho de partícula $4,6 \times 250$ mm da Agilent., com volume de injeção de 20 μ L e um detector a 270 nm

Para a preparação da curva de calibração, foi preparada uma solução de metanol acidificado utilizando 0,5 mL de ácido fosfórico 85% para cada 1000 mL metanol. Depois foram pesados 19,5 mg do padrão ICS-3 e esta massa diluiu-se em 25 mL de metanol acidificado. Esta solução denominou-se solução estoque. A partir desta foi preparada uma solução de trabalho diluindo 1 mL da solução estoque em 10 mL de metanol acidificado. As diluições para construí a curva de calibração para determinação de iso-alfa ácidos foram realizadas a partir da solução estoque. Estas soluções foram injetadas em pentaplicata no HPLC.

4.4. Preparação do mosto fermentado

4.4.1. Preparo do Starter de levedura

O preparo do starter de levedura foi realizado metodologia própria, na qual se diluiu 100 g de extrato de malte seco em um litro de água deionizada, adquirido na loja *Lamas Brew Shop*, localizada em Campinas-SP. A solução com extrato de malte manteve-se em fervura por 15 minutos a fim de garantir a redução da contagem inicial de microrganismos e depois resfriada em banho de gelo até atingir 25 °C. Foram então, preparados 4 erlenmeyers com volume de 1 L cada um com 500 mL do mosto preparado. Após, adicionou-se 5,75 g de leveduras liofilizadas em cada erlenmeyer. Estes foram logo transferidos para um shaker automático com temperatura controlada de 25°C e mantido por 24 horas.

4.4.2. Preparo do mosto fermentado

A fermentação da cerveja foi realizada a partir de mosto produzido com extrato de malte Pale Ale diluído até atingir 8,7 °Brix e então fervido a 100 °C por cerca de 10 minutos em panela de alumínio. As panelas foram então submersas em banho com gelo seco para o resfriamento do mosto até atingir 20 °C. Após, foram preparados 4 fermentadores com volumes diferentes de mosto, sendo dois deles com 4 litros e dois com 10 litros. Aos fermentadores com 4 litros foi adicionado o lúpulo Cascade brasileiro na proporção de 1 g/L, enquanto nos outros dois fermentadores foi adicionado o lúpulo Cascade americano na mesma proporção. A preparação do mosto com o lúpulo Cascade brasileiro foi em menor volume devido à limitação da quantidade de amostra do mesmo lúpulo. Posteriormente, adicionou-se um erlenmeyer contendo 500 mL de starter de levedura em cada fermentador

A fermentação teve duração de 21 dias, sendo que aos 8 primeiros nos fermentadores que estavam localizados em sala climatizada à 20 ± 2 °C e as amostras colhidas diariamente em frascos de vidro âmbar de 100 mL (figura 9). No oitavo dia de experimento, as amostras foram envasadas em frascos de vidro âmbar, etiquetados e mantidos em câmara refrigerada por cerca de 5 °C. Todas as amostras retiradas diariamente foram congeladas com o intuito de interromper a fermentação.

Figura 9 - Frasco com amostra de fermentação



Fonte: Autoria própria

4.5. Análises da cerveja

4.5.1. Quantificação do teor de iso- α -ácidos na cerveja

O teor de iso- α -ácidos na cerveja produzida foi realizado por extração com solvente (isooctano) de acordo com o protocolo Beer-23/B descrito pela *American Society of Brewing Chemists*. Tomou-se uma alíquota de cerca de 100 mL de cerveja, a qual foi congelada corroborando com o método descrito pelo item 4.4.2. No momento em que foi realizada tal análise, as amostras foram descongeladas e então tomou-se uma alíquota de 5 mL, transferindo-a para um tubo Falcon de 50 mL. Depois adicionou-se 2 mL de HCl (6N) e 10 mL de isooctano. Em seguida, os tubos foram levados para uma mesa agitadora orbital a velocidade 8 durante 30 minutos, após foram retirados e centrifugados por 5 minutos a 3000 RPM em centrífuga modelo HN-S e marca Damon, o que corresponde a 907,2 força G e então centrifugados por 15 minutos.

Após a centrifugação, pipetou-se 10 mL do sobrenadante (isooctano) e transferiu-se para outro tubo Falcon de 50 mL. Foram pipetados 10 mL de metanol acidificado (0.68 metanol/ 0.32 HCl 4N) à camada sobrenadante que foi recolhida e transferida para outro tubo Falcon de 50 mL contendo 10 mL de metanol acidificado. Estes tubos foram invertidos por 100 vezes e depois 5 mL da camada sobrenadante foi pipetada e transferida para um balão volumétrico de 25 mL. O balão foi completado com metanol alcalino (1mL NaOH 1N/ 500 mL metanol). Os balões foram invertidos por 30 vezes e então realizou-se a leitura da absorbância em espectrofotômetro calibrado à 255 nm. A solução utilizada como branco foi preparada com 5 mL de isooctano pipetado em balão volumétrico de 25 mL, o qual teve seu volume completado com metanol.

4.5.2. Análise de extrato e álcool na cerveja

Os parâmetros de álcool, extrato e densidade foram medidos diretamente no equipamento Beer Analyser – Antoon Paar (Software version 4.1108). O teor de álcool e extrato seguiram a tabela intrínseca ao equipamento descrita pela *American Society of Brewing Chemists*.

O equipamento tem como princípio de medição direta o período de oscilação da densidade e da velocidade do som medidos em uma célula e a partir destas duas medidas, são calculados os parâmetros de densidade, extrato e álcool (ANTON PAAR, 1993)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Lúpulo

O lúpulo Cascade brasileiro foi analisado quanto a: umidade, α - e β -ácidos totais e frações, % de óleo essencial e teores de mirceno, linalool, geraniol, cariofileno e humuleno. Os resultados podem ser observados na tabela 5.

Tabela 5 - dados lúpulo Cascade brasileiro em comparação com Cascade americano

Análise	Resultado	Valores de referência para Cascade
Umidade	10%	10 %
Alfa-ácidos	5,0%	5,5-9%
Beta-ácidos	3,0%	6-7,5%
Cohumulona	27%	--
N +Adhumulona	73%	--
Colupulona	41%	--
N+Adlupulona	59%	--
Total de óleo essencial	1,55	0,8-2,5 mL/100 g mL/100 g
Mirceno	64%	45-60%
Linalol	0,2%	0,3-0,6%
Geraniol	0,1%	0,2%
Cariofileno	3%	5-9%
Humuleno	15%	14-20%

Valores de Alfa e Beta-Ácidos expressos em base seca a 10% de umidade.

Segundo HARDWICK (1994), dois parâmetros importantes para a avaliação da qualidade de um lúpulo são o *ratio* de *cohumulona* e o *ratio* entre os α - e β -ácidos, descritos no item 2.2.1. Sendo assim, o *ratio* de *cohumulona* obtido com o lúpulo Cascade brasileiro, foi de 5,4, enquanto o valor do *ratio* α : β é de 1,66. Como o valor do *ratio* entre α - e β -ácido se situa entre 1 e 4, sendo desejada quantidades iguais entre estes, para um lúpulo com maior qualidade, pode se dizer que este é um lúpulo desejado para a aplicação no processo cervejeiro (BOULTON, 2013) (DE KEUKELEIRC, 2000).

Levando em consideração os valores de referência para um lúpulo comercial da variedade *Cascade*, o lúpulo *Cascade* brasileiro obteve valor aceitável do teor de α -ácido, porém o teor de β -ácido ficou abaixo do esperado para um lúpulo desta variedade. Em relação aos óleos essenciais, o mirceno foi um composto que representou um valor acima do esperado, enquanto o linalol, geraniol e cariofileno ficaram abaixo do esperado. O linalol e o geraniol, por outro lado, são compostos que possuem um aroma mais floral (HARDWICK, 1994) (KROTTENTHALER, 2009) (SHARP; COLLIER, 2016).

5.2. Isomerização

5.2.1. Total de alfa-ácido

No processamento de cerveja uma das etapas é a fervura, nesta etapa ocorre a adição de lúpulo e conseqüentemente a isomerização dos α -ácidos e a esterilização do mosto. Um dos focos do presente trabalho foi o estudo mais detalhado da solubilização dos α -ácidos do lúpulo ao longo de uma fervura de 90 minutos bem como da cinética de isomerização ao longo desta etapa. Para isso, utilizou-se de três formas diferentes de lúpulo, sendo elas: o lúpulo em flor produzido no Brasil, lúpulo comercial proveniente dos EUA e um padrão de α - e β -ácidos do lúpulo. A porcentagem de α -ácidos presentes nesses lúpulos são 7,5, 6,8 e 44%, respectivamente. A reação de isomerização realizou-se em três meios diferentes, o mosto, uma solução tampão preparada a partir de 3,3-dimetil ácido glutárico e outra preparada com ácido cítrico e citrato. Para efeito de melhor comparação, serão discutidos com maior detalhamento os dados obtidos com a isomerização em mosto. Os demais dados são apresentados no apêndice A. A partir da porcentagem inicial de α -ácido, calculou-se a concentração inicial desses compostos em todas as formas de lúpulo utilizadas, sendo o ensaio com o lúpulo *Cascade* brasileiro foi feito em duplicata, sendo denominados lúpulo *Cascade* Brasileiro I e Lúpulo *Cascade* Brasileiro II, respectivamente. Os resultados estão expressos na tabela 6.

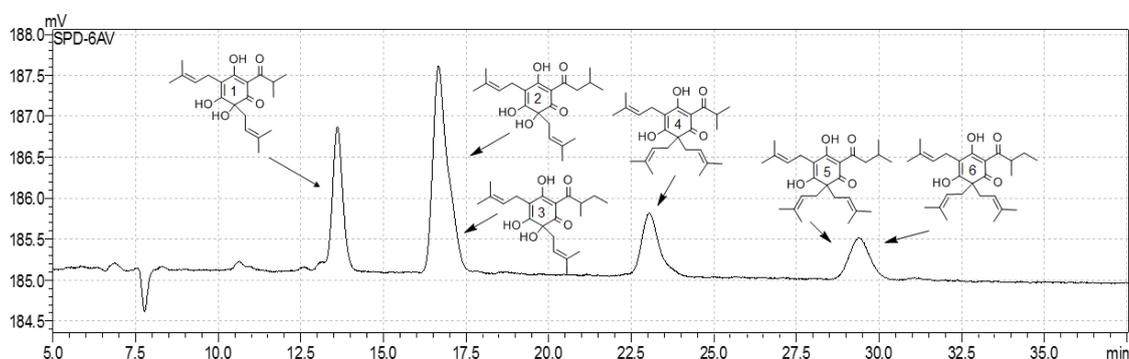
Tabela 6 - Concentração de alfa-ácidos utilizada nos experimentos

Tipo de lúpulo	Alfa-ácido (concentração)	volume (L)	massa de lúpulo (g)	Concentração de alfa-ácido no lúpulo (mg)	Concentração Inicial de alfa-ácido (mg/L)
Padrão	0,4464	0,5	0,1480	66,07	132,13
Lúpulo <i>Cascade</i> brasileiro I	0,075	0,5	0,6684	50,13	100,26
Lúpulo <i>Cascade</i> brasileiro II	0,075	0,5	0,6648	49,86	99,72
Lúpulo <i>Cascade</i> americano	0,068	0,5	0,7701	52,37	104,73

As análises de identificação e quantificação das humulonas foram feitas por HPLC a partir de uma curva de calibração. Como o interesse neste trabalho é a isomerização de α -ácidos, os resultados de β -ácidos não são apresentados. As áreas dos picos dos analitos foram integradas manualmente e, pelo método dos mínimos quadrados, foram obtidos os coeficientes angulares e os coeficientes lineares de cada um deles. Também foram calculados os desvios padrão relativos, limites de detecção, quantificação e coeficiente de correlação para cada analito.

Os coeficientes de variação para os tempos de retenção e área dos picos obtidos com a injeção dos padrões em pentaplicata foram inferiores a 3%. Um cromatograma ilustrando a separação dos analitos pode ser visualizado na figura 10. Os dados mais detalhados sobre a calibração estão expressos no apêndice B. Além disso, o grupo de trabalho não conseguiu a identificação separada dos compostos n- e adhumulona.

Figura 10 - Cromatograma e estruturas das humulonas e lupulonas presentes no padrão ICE-3. 1 – Cohumulona; 2 e 3 – Humulona + Adhumulona; 4 – Colupulona; 5 e 6 – Lupulona + Adlupulona



Fonte: Autoria própria

Sabe-se que a solubilidade dos α -ácidos é baixa em água, no mosto ou na cerveja e segundo Malowicki e Shellhammer (2004), o limite de solubilização desses compostos gira em torno de 90 ppm em pH 5,2. Ademais, a solubilização dos ácidos é dependente de algumas variáveis, dentre elas a forma na qual o lúpulo se encontra. Sendo assim, a isomerização feita durante a fervura do mosto transforma os α -ácidos em moléculas mais solúveis, os iso- α -ácidos.

A isomerização dos lúpulos no presente trabalho foi elaborada com três formas diferentes de lúpulo, que são: em flor, pellets e extrato. Observou-se então que a solubilidade dos ácidos e sua perda durante a reação de isomerização dentre essas três formas ocorreu de maneira diferente, sendo a solubilidade maior no ensaio realizado com o padrão, como demonstrado pela figura 13, com uma perda de α -ácidos já no início da fervura. Em segundo, ficou o ensaio

realizado com os lúpulos em pellets, representado na figura 12, o qual conseguiu solubilização dos α -ácidos logo no início da fervura. Enquanto o lúpulo Cascade brasileiro em flor (figura 11) teve um aumento considerável da quantidade de α -ácidos durante os primeiros 30 minutos de fervura e só então houve a isomerização destes em iso- α -ácidos. Este fator, pode ser explicado pela afinidade que os α -ácidos possuem pela resina do lúpulo, a qual está em estado mais íntegro e menos exposta no lúpulo em flor. Por outro lado, os pellets podem estar em diversas formas, sendo a forma padrão denominada “tipo 90”, a qual é produzida por uma nova secagem das amostras de lúpulo até obter 7% de umidade e, então, moído, homogeneizado, pelletizado, resfriado e embalado à vácuo. Os pellets também podem ser enriquecidos por uma separação mecânica das glândulas de lupulina que aumentam a quantidade de α -ácidos disponíveis, sendo o principal pellet enriquecido denominado “tipo 45”. Estes podem seguir também uma etapa de peneiração do lúpulo à $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ na qual parte da lupulina é separada do restante a fim de aumentar a concentração de compostos de amargor. Portanto, pode-se explicar o fato de o lúpulo em pellet possuir maior quantidade de ácidos amargos disponíveis em relação ao lúpulo em flor, o qual possui sua resina integralmente (BAMFORTH, 2006) (HORNSEY, 1999).

Figura 11 - Concentração de alfa-ácidos do lúpulo Cascade brasileiro em flor ao longo da etapa de fervura

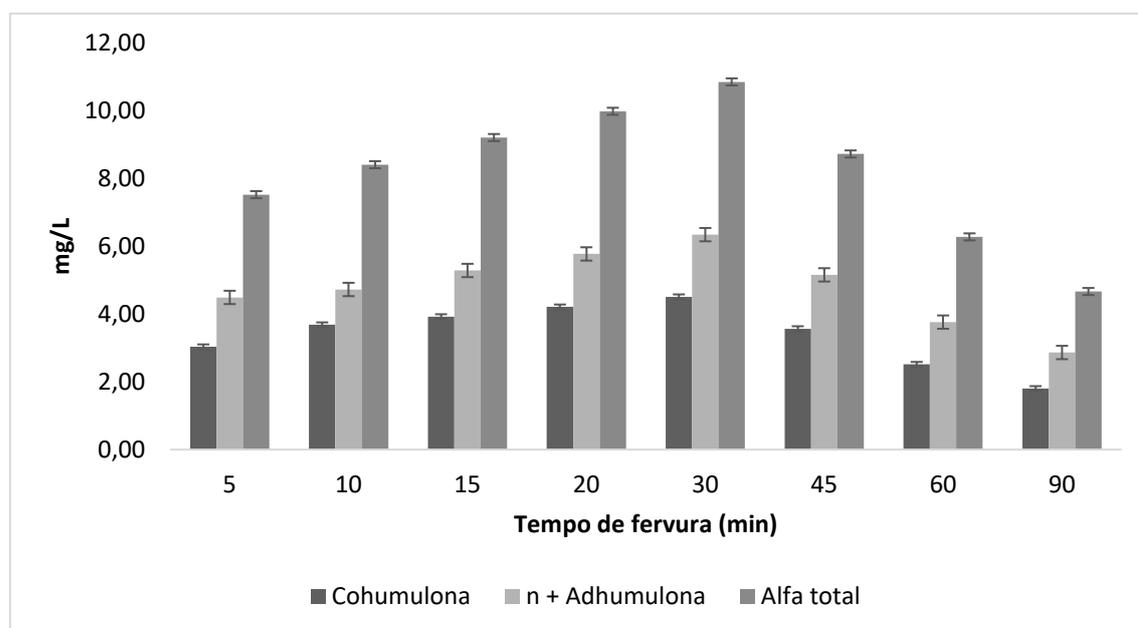


Figura 12 - Concentração de alfa-ácidos do lúpulo Cascade americano em pellets ao longo da etapa de fervura

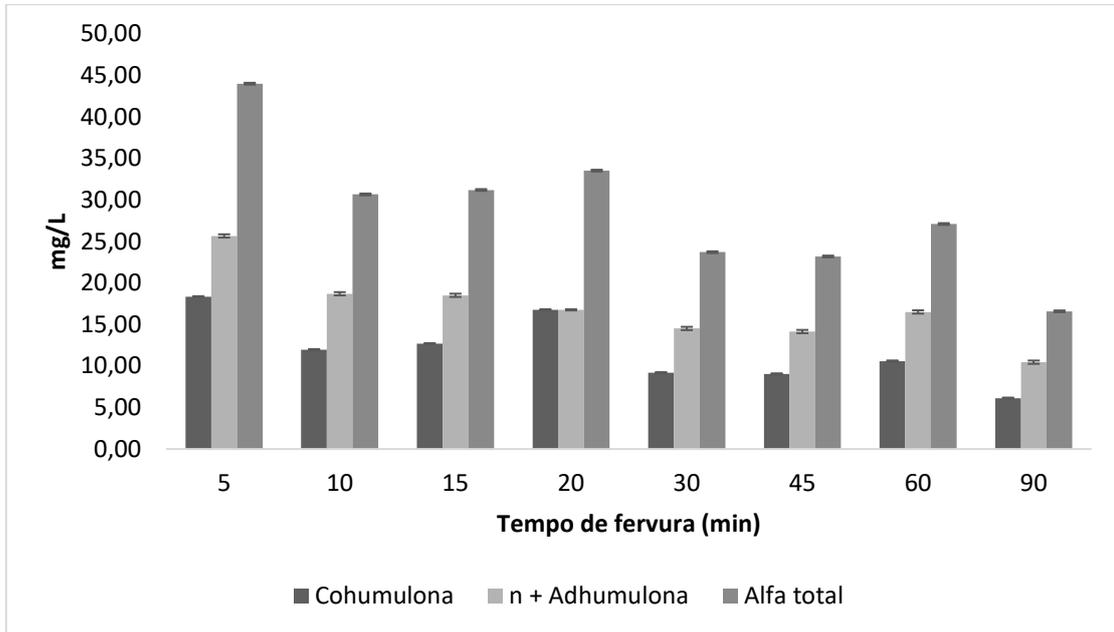
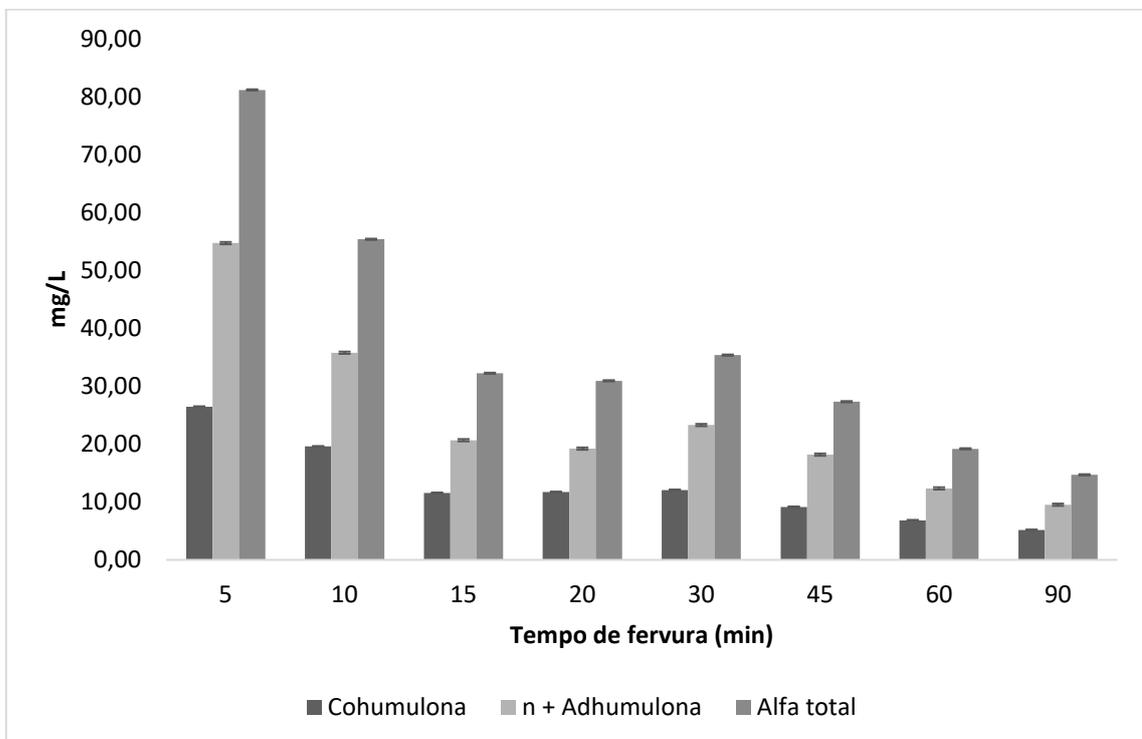
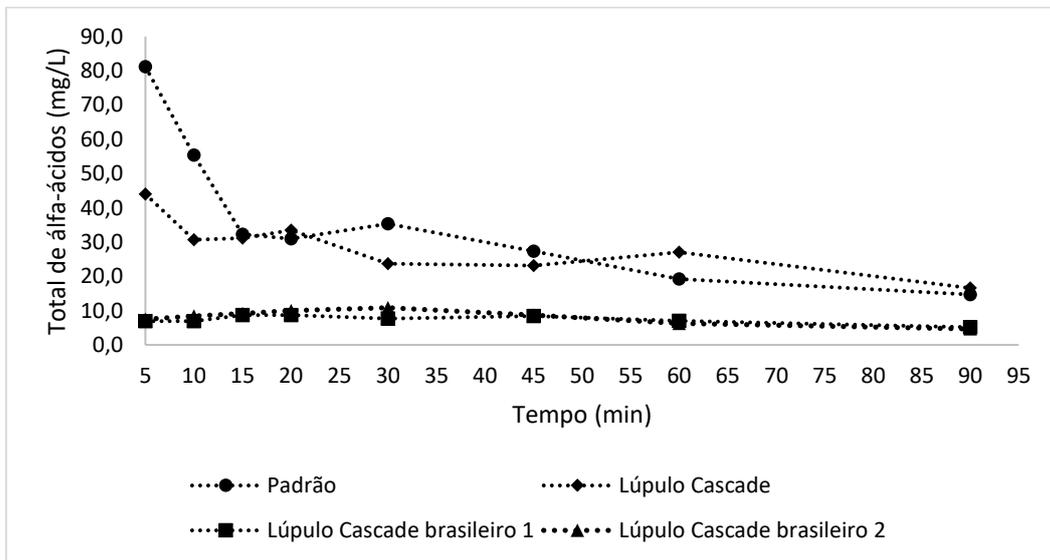


Figura 13 - Concentração de alfa-ácidos do padrão de alfa- e beta ácidos ICE-3 em extrato ao longo da etapa de fervura



A figura 14 apresenta a concentração total de alfa ácidos ao longo da fervura do mosto com os lúpulos adicionados. Nele pode-se observar a maior concentração destes compostos quando se utiliza o lúpulo em pellets e em extrato, enquanto a concentração de α -ácidos do lúpulo em flor é consideravelmente menor. Todavia, a utilização dos α -ácidos é baixa durante o processamento de cerveja, a qual se situa entre 25-30% para o lúpulo adicionado no início da fervura. Estes valores baixos se dão pela relativa inacessibilidade dos α -ácidos nas glândulas de lupulina, além de haver baixa conversão em iso- α -ácidos a pH baixos, como o do mosto (5,2). Outra possível causa da perda dos α -ácidos e seu baixo fator de utilização é a aderência destes compostos na parede dos equipamentos ou tubulação.

Figura 14 - Concentração do total de alfa-ácidos em relação ao tempo de fervura



A tabela 7 apresenta os valores da % de utilização do total de α -ácido de cada lúpulo em relação à concentração teórica apresentada na tabela 6. Observa-se que a média do fator de utilização em relação aos α -ácidos do padrão e do lúpulo em pellet é de acordo com o esperado de acordo com a literatura, com valores médios de 28,03% e 27,45%, respectivamente. Para o lúpulo em flor, entretanto, a utilização foi muito abaixo do esperado, situando em 7,41% no primeiro ensaio e 8,23% no segundo (HARDWICK, 1994) (MARKG.MALOWICKI, 2004).

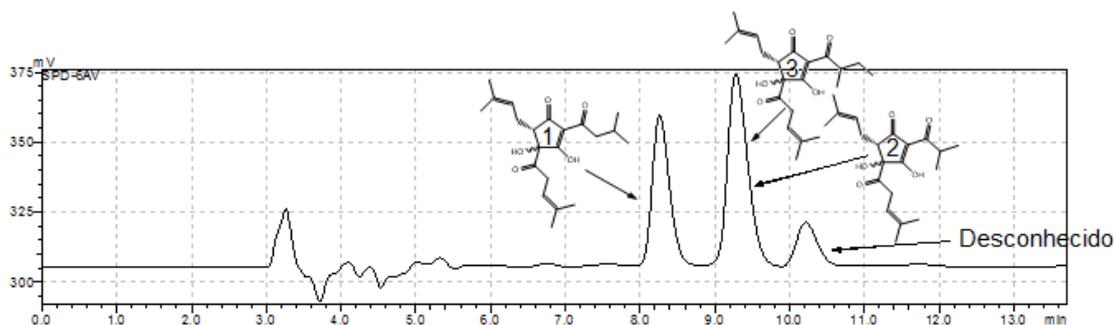
Tabela 7 - fator de utilização de alfa-ácido em relação ao tempo de fervura

Tempo (min)	% utilização Padrão	% utilização Lúpulo Cascade americano	% utilização Lúpulo Cascade brasileiro 1	% utilização Lúpulo Cascade brasileiro 2
5	61,45	42,01	6,89	7,55
10	41,92	29,28	6,89	8,43
15	24,40	29,79	8,68	9,24
20	23,42	32,01	8,66	10,01
30	26,77	22,64	7,62	10,88
45	20,68	22,14	8,37	8,75
60	14,52	25,88	6,99	6,30
90	11,12	15,83	5,15	4,68
Média	28,03	27,45	7,41	8,23

5.2.2. Total de iso- α -ácido

As análises realizadas para a identificação e quantificação de isohumulonas foram feitas por HPLC, para a qual obteve-se preliminarmente uma curva de calibração. Um cromatograma ilustrando a separação dos analitos pode ser visualizado na figura 15.

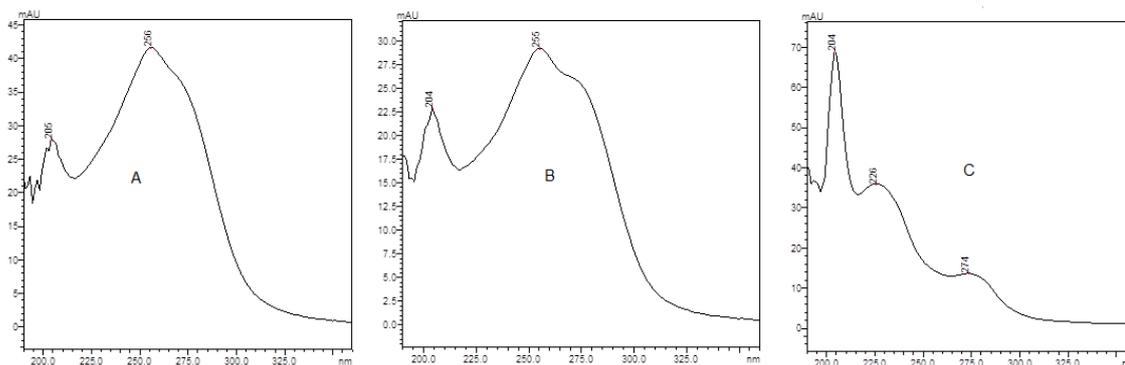
Figura 15 - Cromatograma e estrutura das iso-humulona. 1 – Isocohumulona; 2 e 3 – Isohumulona + Isoadhumulona



Fonte: Autoria própria

Para fins de confirmação dos analitos foram obtidos os espectros de cada analito ou grupo de analito (figura 16).

Figura 16 - Espectro de UV dos dois picos das espécies químicas iso-cohumulona (A), iso-humulona, iso-adhumulona (B) e do pico desconhecido (C)



Fonte: Autoria própria

Picos correspondentes a iso-humulonas possuem um máximo de absorção em 255 ou 256 nm, de modo, que facilmente pode-se inferir que o pico C (composto desconhecido) não corresponde a uma iso-humulona.

As áreas dos picos dos analitos foram integradas manualmente, e pelo método dos mínimos quadrados, foram obtidos os coeficientes angulares e os coeficientes lineares de cada analito. Também foram calculados os desvios padrão relativos, limites de detecção, quantificação e coeficiente de correlação para cada analito. Os coeficientes de variação para os tempos de retenção e área dos picos obtidos com a injeção dos padrões em pentaplicata foram inferiores a 3%. Os demais dados de calibração e as curvas estão apresentados no apêndice B.

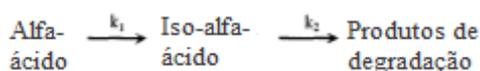
A reação de isomerização, como já descrito, é importante para o desenvolvimento do perfil sensorial da cerveja, já que os compostos isomerizados dos α -ácidos são mais solúveis no mosto e na cerveja, promovendo um amargor desejável ao produto. Alguns autores descreveram o perfil da cinética da reação de isomerização, o qual segue uma reação cinética de primeira ordem de acordo com a equação 6, na qual c é a concentração de α -ácido no tempo t , $c_{inicial}$ é a concentração inicial de α -ácido e k é a constante (minuto^{-1}) (JASKULA et al., 2008) (HUANG; TIPPMANN; BECKER, 2013) (MARKG.MALOWICKI, 2004).

$$\ln \frac{c}{c_{inicial}} = -kt \quad (6)$$

A constante k_I está relacionada à taxa de conversão dos α -ácidos em iso- α -ácidos, de acordo com a figura 17, e foi encontrada a partir da análise pelo método dos quadrados mínimos dos dados da concentração de α -ácidos totais, cohumulona, n+adhumulonas para cada lúpulo, de acordo com a equação 6, e os dados da constante k são apresentados na tabela 8. Os valores são aceitáveis em nível de significância de 95%, porém os valores são superiores aos encontrados por Malowicki e Shellhammer (2004) à temperatura de 100 °C. Isso pode ser explicado pela

alta taxa de perda de ácidos ao longo dos experimentos, ocasionando uma grande diferença entre a concentração inicial de α -ácidos e a concentração medida.

Figura 17 - Reação de isomerização do alfa-ácido pelo aquecimento



Fonte: MALOWICKI, et. al. 2004

Tabela 8 - Coeficiente k calculado para os diferentes tipos de lúpulos

Tipo de lúpulo	α -ácidos totais	Cohumulona	n+Adlhumulona	p-valor
Padrão α - e β -ácidos ICE-3	0,03156	0,03929	0,04022	0,0003
Lúpulo Cascade americano	0,02712	0,03606	0,03606	0,0019
Lúpulo Cascade brasileiro I	0,04249	0,05875	0,05172	0,0054
Lúpulo Cascade brasileiro II	0,04256	0,05145	0,05934	0,0082
Média	0,03593	0,04639	0,04684	
desvio padrão	0,00782	0,01058	0,01065	

Segundo Jaskula et al. (2008), a taxa constante k se altera de acordo com a temperatura e pode ser descrita pela equação de Arrhenius (equação 7), onde E_a é a energia de ativação necessária para que a reação se inicie, R é a constante dos gases, T é a temperatura em kelvin e A é o fator pre-exponencial. As equações completas para k_1 e k_2 com todos os parâmetros foi descrita por Malowicki e Shellhammer (2004) e estão representadas pelas equações 8 e 9. Essas foram obtidas a partir do gráfico de $\log(k)$ por $1/T$, onde o coeficiente linear da curva obtida é a energia de ativação (E_a) e A a constante de intersecção do gráfico.

$$k = A e^{\frac{-E_a}{RT}} \quad (7)$$

$$k_1 = (7,9 \times 10^{11}) e^{\frac{-11858}{T}} \quad (8)$$

$$k_2 = (4,1 \times 10^{12}) e^{\frac{-12994}{T}} \quad (9)$$

Segundo os mesmos autores, para situações com temperatura constante ao longo do tempo, como no caso do experimento desenvolvido neste trabalho, e com uma concentração inicial de iso- α -ácido igual a zero, a concentração de iso- α -ácido (C_{iso}) pode ser determinada ao longo do tempo pela equação 10. As constantes k_1 e k_2 calculadas para a temperatura de 100 °C tem os valores de 0,0125 e 0,0031 (minuto⁻¹), respectivamente.

$$C_{iso} = \frac{k_1(C_{alfa,inicial})}{k_2 - k_1} (e^{-k_1 t} - e^{-k_2 t}) \quad (10)$$

Tabela 9 - Equação da concentração de iso-alfa-ácido em relação ao tempo à 100°C para cada tipo de lúpulo

Tipo de lúpulo	Concentração inicial de alfa-ácido	Equação
Padrão α- e β-ácidos ICE-3	132,13	$C_{iso} = -175,70 (e^{-0,0125t} - e^{-0,0031t})$
Lúpulo Cascade brasileiro I	100,26	$C_{iso} = -133,32 (e^{-0,0125t} - e^{-0,0031t})$
Lúpulo Cascade brasileiro II	99,72	$C_{iso} = -132,61 (e^{-0,0125t} - e^{-0,0031t})$
Lúpulo Cascade americano	104,73	$C_{iso} = -139,27 (e^{-0,0125t} - e^{-0,0031t})$

A relação de perda de α -ácidos não é diretamente proporcional ao aparecimento de iso- α -ácido, principalmente nos primeiros momentos da fervura, como já foi observado por outros autores. A concentração de iso- α -ácido dos diferentes lúpulos utilizados ao longo do tempo está apresentada no figura 18. O segundo ensaio realizado com o lúpulo Cascade brasileiro não foi adicionado ao gráfico, pois, como mostra a tabela 10, nos tempos de fervura de 5, 10, 15 e 20 minutos as quantidades de iso- α -ácidos encontradas estavam abaixo dos limites de quantificação (ASKEW, 1964)

Segundo Caballero et.al. (2012), a concentração de iso- α -ácido na cerveja varia entre 15 e 100 mg/L, nas figuras de 18 a 20 estão os valores da concentração de iso- α -ácido ao longo da isomerização do padrão, lúpulo *Cascade* americano e lúpulo *Cascade* brasileiro, respectivamente. Após 90 minutos de fervura, o mosto com o padrão atingiu uma concentração de iso- α -ácidos 46,79 mg/L. Enquanto o mosto fervido com lúpulo *Cascade* brasileiro e lúpulo *Cascade* americano atingiram a concentração de iso- α -ácidos após o mesmo tempo de 9,16 mg/l e 31,52 mg/l, respectivamente. O lúpulo *Cascade* brasileiro apresentou valor abaixo daquele encontrado na literatura, pois este lúpulo foi utilizado em forma de flor, o que pode explicar a baixa solubilidade e disponibilidade dos ácidos para a reação de isomerização. Por outro lado, o padrão e o lúpulo, *Cascade* americano apresentaram valores coerentes com a literatura, o que demonstra maior poder de solubilização e maior disponibilidade dos ácidos presentes na resina dos extratos e pellets.

Como demonstrado pelas equações na tabela 9, a concentração de iso- α -ácidos em relação ao tempo segue uma equação exponencial, como demonstrado pela curva de ajuste delineada nas figuras.

Figura 18 - Concentração de iso-alfa-ácidos do padrão de alfa- e beta-ácidos ICE-3 em mosto

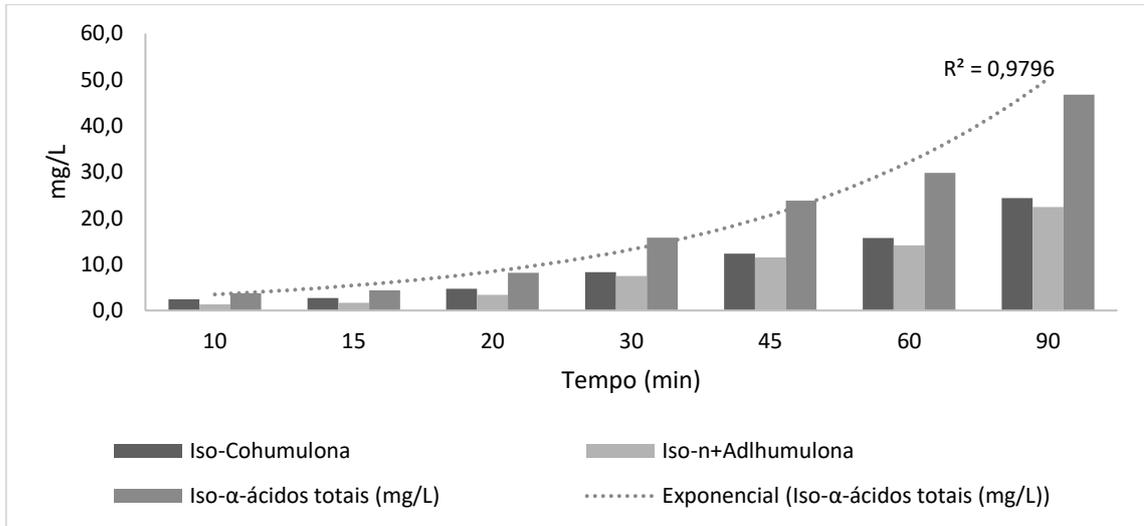


Figura 19 - Concentração de iso-alfa-ácidos do lúpulo Cascade americano em mosto

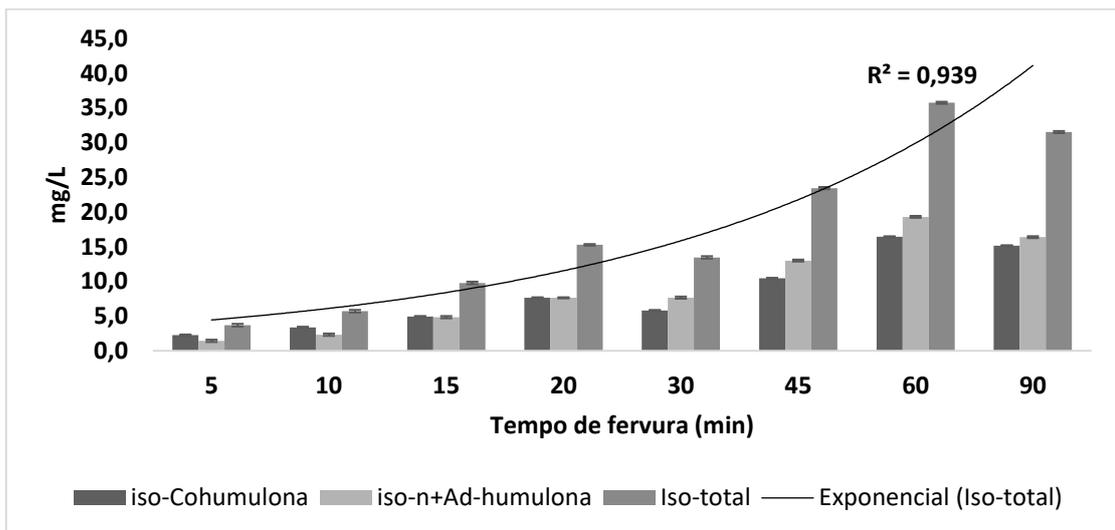
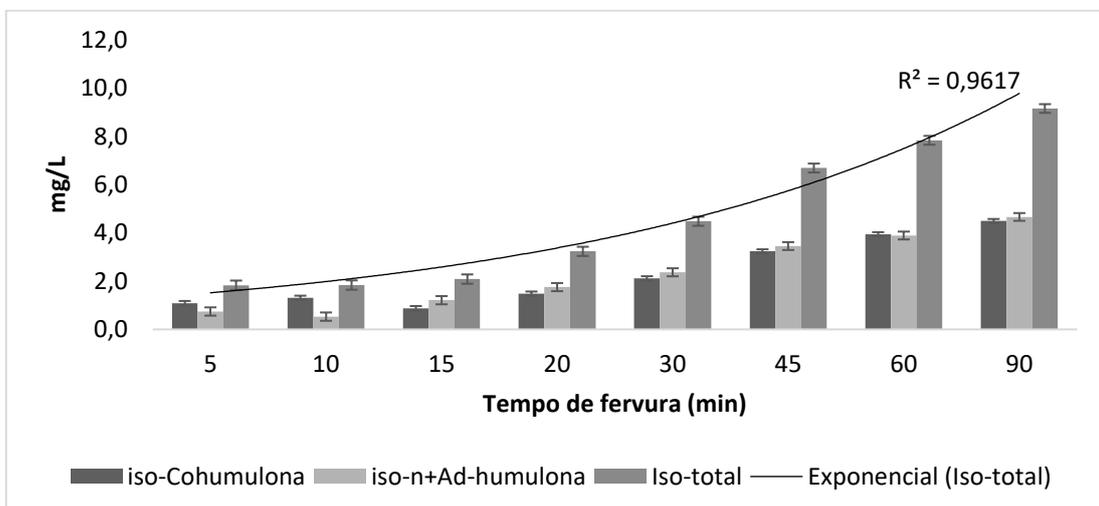


Figura 20 - Concentração de iso-alfa-ácidos do lúpulo cascade brasileiro em mosto



A taxa de utilização de iso- α -ácidos foi calculada levando-se em consideração a concentração destes compostos em cada tempo em relação à concentração inicial teórica de α -ácidos. No entanto, como anteriormente mencionado, a concentração inicial calculada é consideravelmente maior que a real, já que houveram perdas ao longo do processo. Sendo assim, a porcentagem de utilização ficou abaixo do esperado. Malowicki e Shellhammer (2004) encontraram uma taxa de utilização de 77% em 120 minutos de fervura à 100 °C. Este valor é acima do valor médio encontrado no presente trabalho, primeiramente pelo tempo de fervura desenvolvido e também pelas perdas já mencionadas. Os valores da porcentagem de utilização calculados estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10 - % de utilização dos iso-alfa-ácidos em relação à concentração inicial de alfa-ácido

Tempo (min)	% de utilização Padrão α- e β-ácidos ICE-3	% de utilização Lúpulo Cascade em pellets	% de utilização Lúpulo Cascade brasileiro I	% de utilização Lúpulo Cascade brasileiro I
5	0,00	3,53	1,83	0,00
10	2,86	5,45	1,83	0,00
15	3,33	9,34	2,08	0,00
20	6,17	14,58	3,23	0,00
30	11,95	12,86	4,47	0,00
45	18,03	22,39	6,67	3,52
60	22,58	34,13	7,82	4,40
90	35,41	30,10	9,14	6,83
Média	12,54	16,55	4,63	1,84

5.3. Fermentação

5.3.1. Cinética da fermentação alcoólica

A fermentação consiste em uma das etapas mais importantes do processamento de cerveja, quando ocorre o metabolismo de fermentação alcoólica desenvolvido pelas leveduras, além de subprodutos que caracterizam o perfil sensorial do produto. No presente trabalho, desenvolveu-se uma fermentação e maturação por 21 dias de um mosto preparado a partir de extrato de malte, com densidade inicial de 8,7 °Brix. Uma das medidas mais utilizadas pela indústria cervejeira para monitorar o final da fermentação é a medida de densidade, a qual fornece uma estimativa da quantidade de açúcar presente no mosto, uma vez que a densidade aumenta de acordo com o acréscimo de sólidos solúveis. O comportamento da levedura foi semelhante em ambos os tanques, com o lúpulo Cascade brasileiro e com o lúpulo Cascade americano, como demonstram os dados apresentados nas figuras 21 e 22. Os dados foram submetidos à ANOVA ($p < 0,0001$)

e, em seguida, análise de Tukey com a finalidade de obter a diferença estatística entre os dias. Como pode-se observar, os dados são estatisticamente semelhantes perante o sexto dia de fermentação, demonstrando o fim desta etapa e início da maturação. Não há os dados referentes ao quinto dia de fermentação devido à perda durante o experimento.

Figura 21 - Consumo de açúcar ao longo da fermentação de mosto adicionado com o lúpulo Cascade

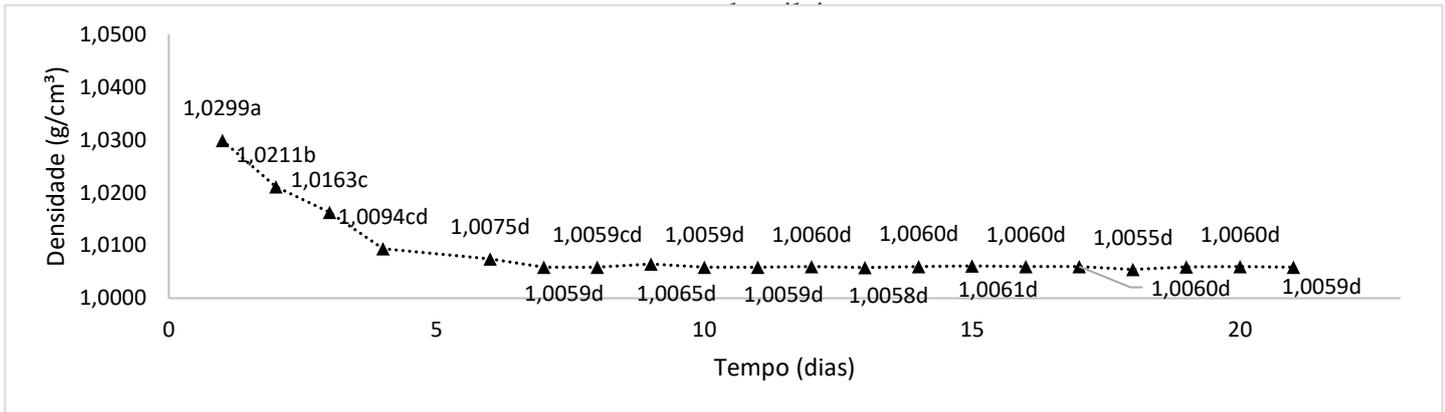
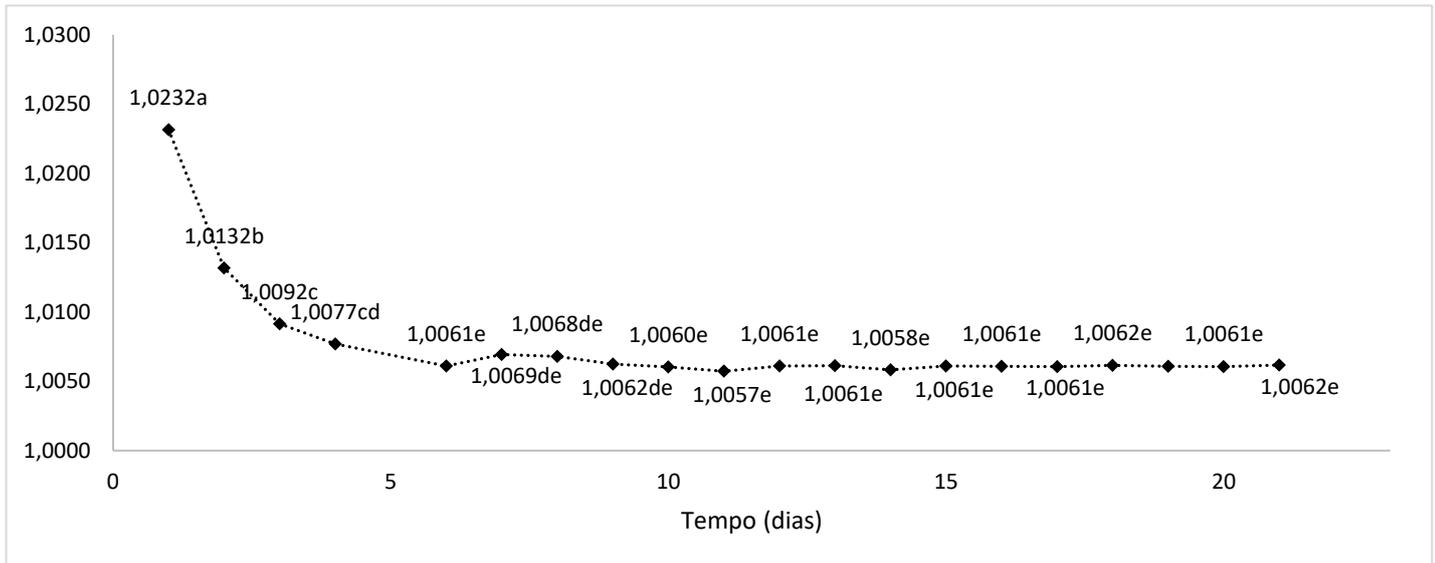


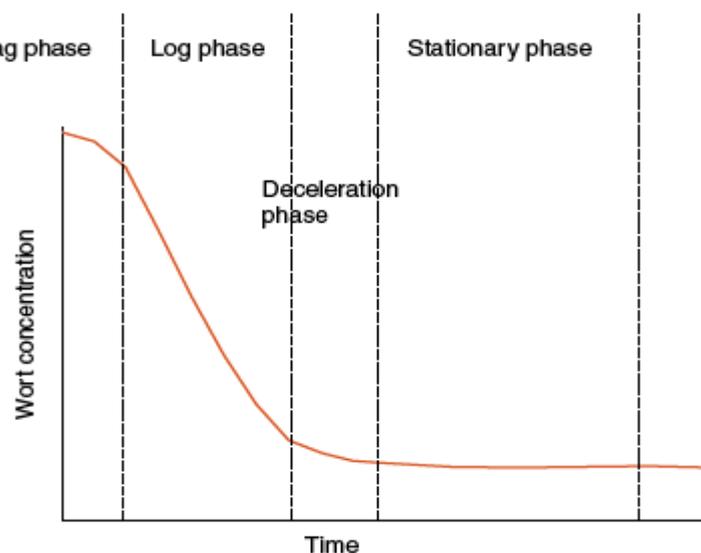
Figura 22 - Consumo de açúcar ao longo da fermentação de mosto adicionado com o lúpulo Cascade americano



O crescimento e propagação das células de levedura ocorre de maneira gradual, e enquanto há a replicação das células, os nutrientes são consumidos e alguns produtos formam-se. A fermentação possui fases semelhantes ao crescimento celular, podendo ser medida de acordo com o decaimento da densidade do mosto ao longo da fermentação (figura 23). Pode-se então, relacionar a cinética de crescimento celular, a qual possui quatro fases, com a cinética da fermentação. Com isso, primeiramente, ocorre a fase lag, onde geralmente precede a fase exponencial e é quando ocorre a adaptação das leveduras ao meio. Logo após, acontece a fase exponencial, na qual o crescimento celular segue uma curva exponencial, ou seja, as células se dividem em um intervalo constante. A duração da fase exponencial é controlada pela composição e o estado físico do meio, assim como o número de células por unidade de volume. Em seguida, depois de um certo tempo e das condições ambientais, além da cepa de levedura, há a fase estacionária, na qual a taxa de crescimento se desacelera e a contagem de células se torna constante (COOK, 1958) (NAHAFPOUR, 2007).

Como no experimento realizado, não houve a contagem do número de células, a construção da curva cinética de crescimento não foi possível. Porém, as etapas podem ser observadas a partir dos dados da concentração de açúcar, extrato e produção de álcool (tabelas 10 e 11). Não se observou a fase lag, visto que as leveduras passaram por um processo de starter primeiro, no qual houve possível crescimento e adaptação das células de levedura. Ao longo dos primeiros 5 dias, houve grande consumo de substratos e produção de álcool, o que pode ser representado pela fase exponencial de crescimento celular. Após o sexto dia, como já mencionado, há a taxa constante dos parâmetros analisados, portanto, nesta fase ocorreu a fase estacionária do crescimento. Este perfil observado com os dados obtidos com a etapa de fermentação do experimento segue aquele apresentado pela literatura na figura 23.

Figura 23 - Fases da fermentação de acordo com a densidade do mosto em relação ao tempo



Fonte: BOULTON, 2003

Tabela 11 - Dados de álcool, extrato e densidades do mosto com lúpulo Cascade brasileiro durante a fermentação

Dia	%A (m/m)	%A (v/v)	%E real (m/m)	%E aparente (m/m)	OG ⁸ (°P)	SG (20/20)
1	0,98 ± 0,08 ^e	1,27 ± 0,10 ^e	6,26 ± 0,10 ^a	5,82 ± 0,14 ^a	8,20 ± 0,12 ^a	1,0229 ± 0,00 ^a
2	1,72 ± 0,05 ^d	2,19 ± 0,07 ^d	4,77 ± 0,02 ^b	3,98 ± 0,04 ^b	8,16 ± 0,08 ^a	1,0156 ± 0,00 ^b
3	2,05 ± 0,03 ^c	2,62 ± 0,04 ^c	3,82 ± 0,02 ^c	2,86 ± 0,03 ^c	7,87 ± 0,05 ^a	1,0112 ± 0,00 ^c
4	2,43 ± 0,19 ^b	3,11 ± 0,29 ^b	3,50 ± 0,25 ^{cd}	2,36 ± 0,16 ^d	8,33 ± 0,69 ^a	1,0092 ± 0,00 ^d
6	2,45 ± 0,12 ^b	3,11 ± 0,15 ^b	3,11 ± 0,27 ^d	1,97 ± 0,22 ^e	7,95 ± 0,49 ^a	1,0077 ± 0,00 ^e
7	2,39 ± 0,19 ^b	3,04 ± 0,26 ^b	3,09 ± 0,46 ^d	1,97 ± 0,37 ^e	7,82 ± 0,82 ^a	1,0077 ± 0,00 ^{de}
8	2,53 ± 0,08 ^a	3,22 ± 0,09 ^{ab}	3,30 ± 0,05 ^d	2,13 ± 0,03 ^{de}	8,30 ± 0,18 ^a	1,0083 ± 0,00 ^{de}
9	2,42 ± 0,31 ^b	3,08 ± 0,41 ^b	3,10 ± 0,54 ^d	1,96 ± 0,40 ^e	7,88 ± 1,13 ^a	1,0077 ± 0,00 ^e
10	2,46 ± 0,11 ^b	3,10 ± 0,14 ^b	3,13 ± 0,06 ^d	2,01 ± 0,02 ^{de}	7,92 ± 0,25 ^a	1,0077 ± 0,00 ^{de}
11	2,48 ± 0,04 ^b	3,10 ± 0,08 ^b	3,20 ± 0,06 ^d	2,08 ± 0,08 ^{de}	8,00 ± 0,12 ^a	1,0082 ± 0,00 ^{de}
12	2,57 ± 0,04 ^{ab}	3,26 ± 0,03 ^{ab}	3,17 ± 0,02 ^d	1,98 ± 0,03 ^e	8,23 ± 0,03 ^a	1,0077 ± 0,00 ^{de}
13	2,49 ± 0,05 ^b	3,16 ± 0,06 ^{ab}	3,18 ± 0,06 ^d	2,02 ± 0,06 ^{de}	8,08 ± 0,06 ^a	1,0079 ± 0,00 ^{de}
14	2,50 ± 0,04 ^b	3,17 ± 0,05 ^{ab}	3,20 ± 0,03 ^d	2,03 ± 0,03 ^{de}	8,11 ± 0,10 ^a	1,0080 ± 0,00 ^{de}
15	2,41 ± 0,13 ^b	3,06 ± 0,16 ^b	3,12 ± 0,07 ^d	2,00 ± 0,02 ^{de}	7,89 ± 0,30 ^a	1,0078 ± 0,00 ^{de}
16	2,41 ± 0,12 ^b	3,07 ± 0,17 ^b	3,13 ± 0,07 ^d	2,01 ± 0,08 ^{de}	7,90 ± 0,30 ^a	1,0078 ± 0,00 ^{de}
17	2,81 ± 0,09 ^a	3,56 ± 0,11 ^a	3,17 ± 0,01 ^d	1,86 ± 0,05 ^e	8,68 ± 0,17 ^a	1,0073 ± 0,00 ^e
18	2,47 ± 0,02 ^b	3,14 ± 0,03 ^b	3,16 ± 0,04 ^d	2,01 ± 0,05 ^{de}	8,04 ± 0,03 ^a	1,0078 ± 0,00 ^{de}
19	2,52 ± 0,05 ^{ab}	3,21 ± 0,07 ^{ab}	3,18 ± 0,02 ^d	2,01 ± 0,04 ^{de}	8,18 ± 0,09 ^a	1,0077 ± 0,00 ^e
20	2,48 ± 0,05 ^b	3,14 ± 0,05 ^b	3,15 ± 0,05 ^d	2,00 ± 0,06 ^{de}	8,02 ± 0,04 ^a	1,0078 ± 0,00 ^{de}
21	2,53 ± 0,01 ^{ab}	3,19 ± 0,02 ^{ab}	3,19 ± 0,04 ^d	2,03 ± 0,05 ^{de}	8,14 ± 0,02 ^a	1,0077 ± 0,00 ^{de}

⁸ A gravidade original foi calculada para todos os dias a fim de se obter a validação das demais variáveis.

Tabela 12 - Dados de álcool, extrato e densidades do mosto com lúpulo Cascade americano durante a fermentação

Dia	%A (m/m)	%A (v/v)	%E real (m/m)	%E aparente (m/m)	OG (°P)	SG (20/20)
1	0,73 ± 0,02 ^d	0,94 ± 0,02 ^d	6,64 ± 0,14 ^a	6,32 ± 0,15 ^a	8,07 ± 0,12 ^{ab}	1,0250 ± 0,00 ^a
2	1,60 ± 0,11 ^c	2,04 ± 0,14 ^c	4,56 ± 0,27 ^b	3,82 ± 0,22 ^b	7,72 ± 0,46 ^b	1,0150 ± 0,00 ^b
3	2,08 ± 0,11 ^{bc}	2,65 ± 0,14 ^{bc}	3,77 ± 0,05 ^c	2,80 ± 0,10 ^c	7,88 ± 0,15 ^b	1,0110 ± 0,00 ^c
4	2,33 ± 0,09 ^b	2,97 ± 0,13 ^b	3,52 ± 0,17 ^{cd}	2,44 ± 0,14 ^{cd}	8,12 ± 0,34 ^{ab}	1,0095 ± 0,00 ^{cd}
6	2,35 ± 0,14 ^b	2,98 ± 0,21 ^b	3,12 ± 0,41 ^d	2,02 ± 0,34 ^{de}	7,78 ± 0,71 ^b	1,0079 ± 0,00 ^{de}
7	2,37 ± 0,19 ^b	3,02 ± 0,24 ^b	3,23 ± 0,41 ^d	2,12 ± 0,33 ^{de}	7,92 ± 0,75 ^{ab}	1,0083 ± 0,00 ^{de}
8	2,53 ± 0,03 ^{ab}	3,22 ± 0,04 ^{ab}	3,38 ± 0,08 ^{cd}	2,20 ± 0,08 ^{de}	8,37 ± 0,10 ^{ab}	1,0086 ± 0,00 ^{de}
9	2,95 ± 0,84 ^a	3,75 ± 1,07 ^a	3,42 ± 0,27 ^{cd}	2,06 ± 0,11 ^{de}	9,22 ± 1,86 ^a	1,0080 ± 0,00 ^{de}
10	2,38 ± 0,03 ^b	3,01 ± 0,04 ^b	3,15 ± 0,07 ^d	2,05 ± 0,06 ^{de}	7,84 ± 0,11 ^b	1,0080 ± 0,00 ^{de}
11	2,35 ± 0,12 ^b	2,97 ± 0,16 ^b	3,04 ± 0,21 ^d	1,96 ± 0,15 ^e	7,66 ± 0,44 ^b	1,0077 ± 0,00 ^e
12	2,45 ± 0,02 ^b	3,10 ± 0,02 ^b	3,19 ± 0,01 ^d	2,05 ± 0,01 ^{de}	7,99 ± 0,03 ^{ab}	1,0080 ± 0,00 ^{de}
13	2,38 ± 0,14 ^b	3,02 ± 0,18 ^b	3,14 ± 0,22 ^d	2,04 ± 0,16 ^{de}	7,83 ± 0,48 ^b	1,0079 ± 0,00 ^{de}
14	2,24 ± 0,03 ^b	2,85 ± 0,04 ^b	3,00 ± 0,02 ^d	1,96 ± 0,01 ^e	7,44 ± 0,08 ^b	1,0077 ± 0,00 ^e
15	2,30 ± 0,07 ^b	2,92 ± 0,08 ^b	3,10 ± 0,15 ^d	2,03 ± 0,15 ^{de}	7,65 ± 0,13 ^b	1,0079 ± 0,00 ^{de}
16	2,41 ± 0,25 ^b	3,05 ± 0,32 ^b	3,15 ± 0,38 ^d	2,03 ± 0,28 ^{de}	7,89 ± 0,85 ^b	1,0080 ± 0,00 ^{de}
17	2,49 ± 0,10 ^{ab}	3,12 ± 0,10 ^b	3,18 ± 0,05 ^d	2,05 ± 0,03 ^{de}	8,03 ± 0,20 ^{ab}	1,0080 ± 0,00 ^{de}
18	2,48 ± 0,08 ^{ab}	3,16 ± 0,12 ^{ab}	3,21 ± 0,02 ^d	2,05 ± 0,07 ^{de}	8,11 ± 0,16 ^{ab}	1,0080 ± 0,00 ^{de}
19	2,43 ± 0,04 ^b	3,09 ± 0,05 ^b	3,15 ± 0,03 ^d	2,03 ± 0,04 ^{de}	7,95 ± 0,06 ^{ab}	1,0079 ± 0,00 ^{de}
20	2,43 ± 0,03 ^b	3,08 ± 0,02 ^b	3,16 ± 0,06 ^d	2,03 ± 0,05 ^{de}	7,90 ± 0,02 ^b	1,0079 ± 0,00 ^{de}
21	2,46 ± 0,02 ^b	3,12 ± 0,01 ^b	3,21 ± 0,01 ^d	2,07 ± 0,01 ^{de}	8,03 ± 0,02 ^{ab}	1,0081 ± 0,00 ^{de}

Durante a cinética de fermentação costuma-se medir o *ratio* da biomassa de levedura produzida ao longo do processo, além da taxa de produção de produto em relação ao consumo de substrato. Entretanto, como no presente trabalho não foi mensurada a contagem celular ao longo do processo, não há como medir o *ratio* de biomassa. Por outro lado, mediu-se o teor de álcool produzido ao longo dos 21 dias de experimento, assim como o extrato consumido como medida do extrato real e aparente, e também a densidade específica. Como parâmetro de controle da medição dos dados de álcool e extrato, mediu-se também a densidade original, onde deve permanecer constante ao longo do tempo. Estes dados medidos estão apresentados nas tabelas 10 e 11.

Com o objetivo de analisar se houve diferença significativa de cada parâmetro medido ao longo dos dias de fermentação, realizou-se a ANOVA, nela todos os parâmetros analisados obtiveram p-valor <0,05, ou seja, houve diferença significativa entre os dias. Posteriormente, os dados foram submetidos à análise Tukey, demonstrando quais dados se diferenciam. Na

tabela 10, pode-se observar que há diferença entre os dados de % álcool (m/m), % álcool (v/v) e % extrato real (m/m) até o quarto dia de fermentação, após este dia os dados são semelhantes estatisticamente. Enquanto, para a % de extrato aparente (m/m) e gravidade específica (SG 20/20) houve diferença entre os dados até o sexto dia de fermentação, mantendo-se constante até o final da fermentação. A gravidade original não apresentou diferença significativa entre os dias, ou seja, há coerência com os dados de álcool e extrato medidos.

Na tabela 11, estão apresentados os mesmos parâmetros medidos, porém no mosto adicionado de lúpulo Cascade americano. Observou-se que a % álcool (m/m), % álcool (v/v) e % extrato real (m/m), assim como no tanque com lúpulo Cascade brasileiro, tiveram diferenças entre os dados medidos até o quarto dia de fermentação, mantendo-se constante após este dia. Já para % extrato aparente e gravidade específica (SG 20/20), os valores medidos foram diferentes até o sexto dia de fermentação. Em relação à gravidade original, houve diferença total entre os valores somente no nono dia de fermentação, isso pode ser explicado por algum erro experimental, já que as amostras foram envasadas sem homogeneização do mosto, o que pode ter ocasionado diferença de concentração entre as amostras.

A reação metabólica principal da fermentação alcoólica na cerveja está relacionada com o consumo dos açúcares para a produção de álcool e CO₂, de acordo com a equação estequiométrica representada pela equação 11. Sendo assim, as figuras 24 e 26 mostram o consumo dos extratos e produção de álcool ao longo da fermentação. Em ambos os ensaios, como já mencionado, houve estabilização dos valores a partir do sexto dia de fermentação. Pode-se observar também que há uma tendência exponencial nos primeiros dias de fermentação antes da estabilização, representado pela cinética do consumo de substrato e produção do produto, como mostram as figuras 25 e 27 (NAJAFPOUR, 2007).



Figura 24 - Produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade brasileiro ao longo da fermentação

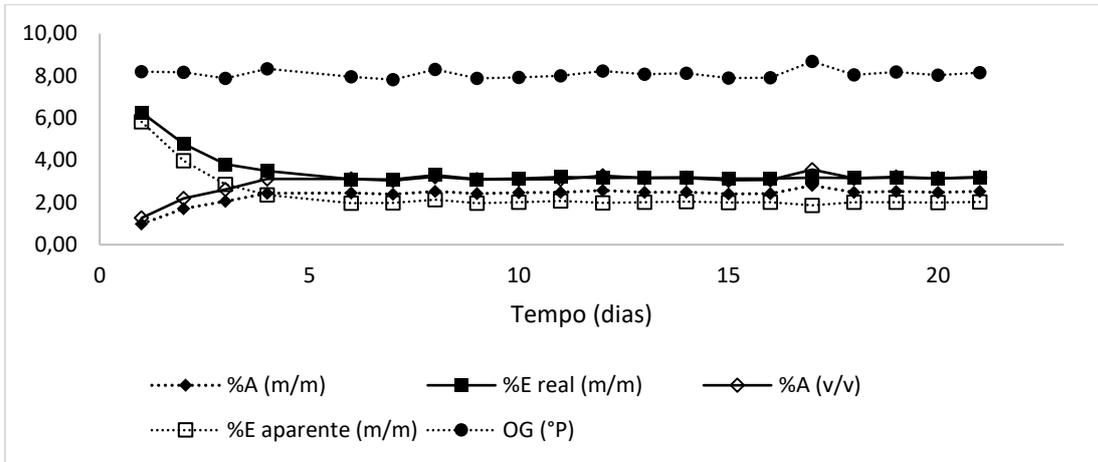


Figura 25 - Cinética de produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade brasileiro nos primeiros 6 dias de fermentação

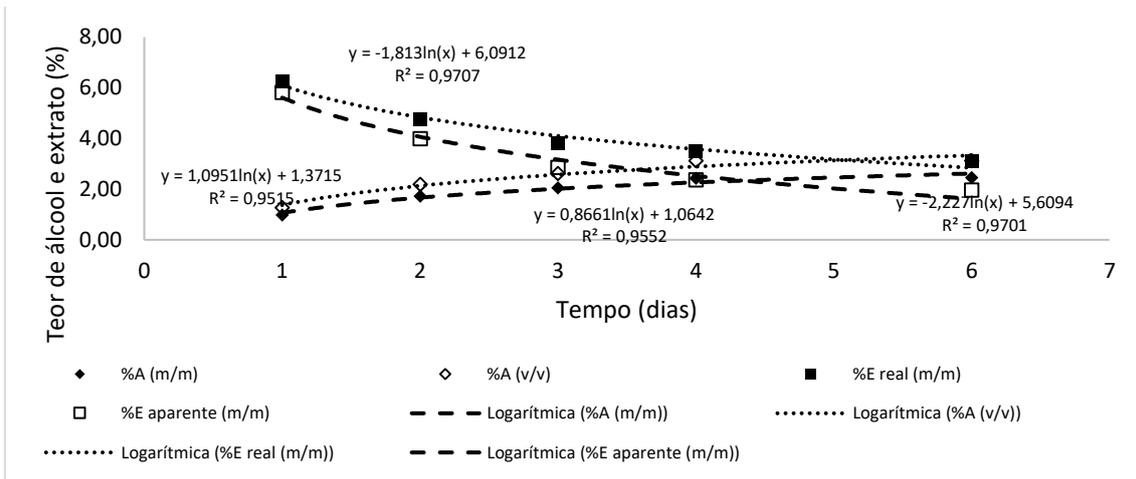


Figura 26 - Produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade americano ao longo da fermentação

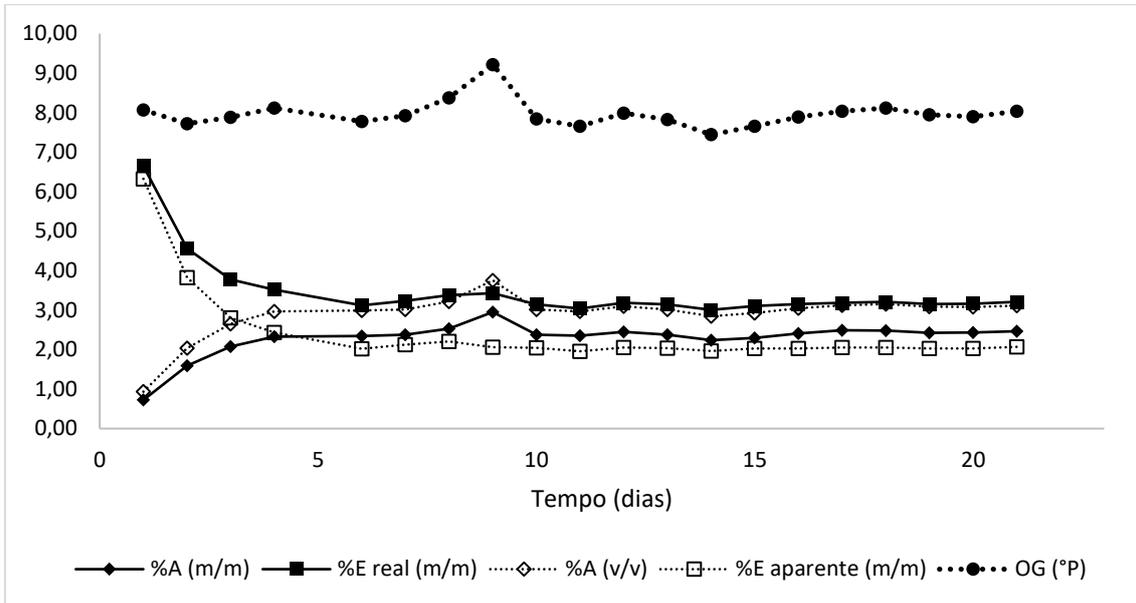
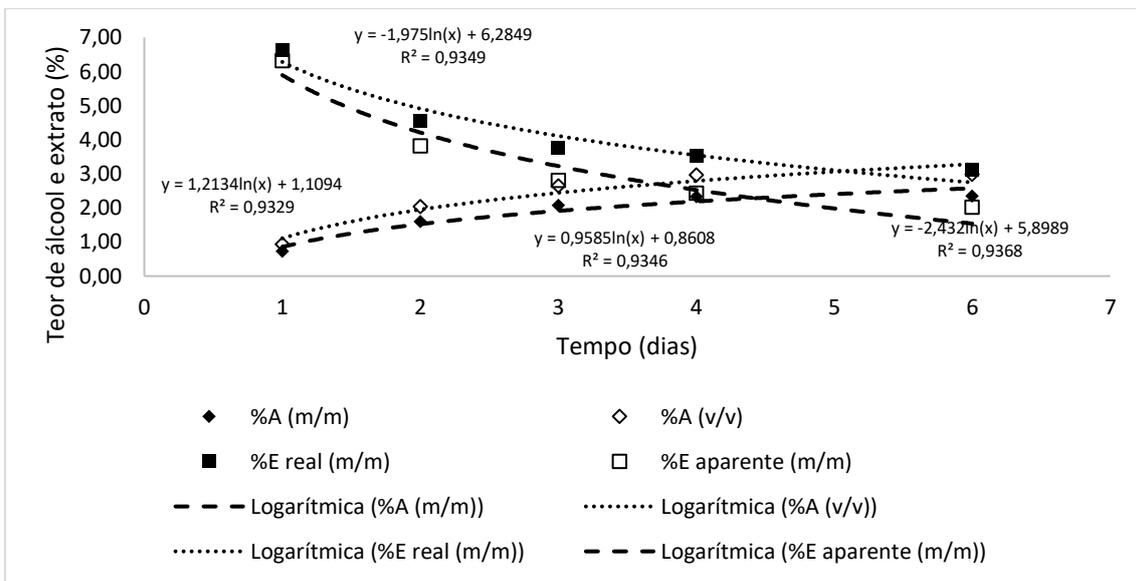


Figura 27 - Cinética de produção de álcool e consumo de extrato do mosto com lúpulo Cascade americano nos primeiros 6 dias de fermentação



5.3.2. Rendimento da produção de álcool

A partir da relação estequiométrica apresentada pela equação 11 e sabendo que o peso molecular do etanol é 46 g/mol e da glicose é 180 g/mol, consegue-se obter o rendimento teórico de produção do etanol, representada pela equação 12 (NAHAFPOUR, 2007).

$$\frac{2 \text{ mol EtOH}}{\text{mol } C_6H_{12}O_6} = \frac{2 \times 46}{180} = 0,511 \frac{\text{g EtOH}}{\text{g } C_6H_{12}O_6} \quad (12)$$

De acordo com Nahafpour (2007), a taxa de produção de produto em relação ao consumo de substrato pode ser descrita pela equação 13, onde P é o produto, S o substrato e $Y_{P/S}$ é o rendimento da reação. Tal equação, ao ser integrada dá origem à equação 14, a qual representa uma produção linear do produto em relação ao consumo de substrato e C é a constante de integração. Por sua vez, o rendimento $Y_{P/S}$ pode ser calculado pela equação 15.

$$\frac{dP}{dt} = -Y_{P/S} \frac{dS}{dt} \quad (13)$$

$$P(t) = -Y_{P/S} S(t) + C \quad (14)$$

$$Y_{P/S} = -\frac{\Delta P}{\Delta S} \quad (15)$$

Figura 28 - Aumento do teor de álcool (P) em relação ao extrato (S) no mosto fermentado com lúpulo Cascade brasileiro

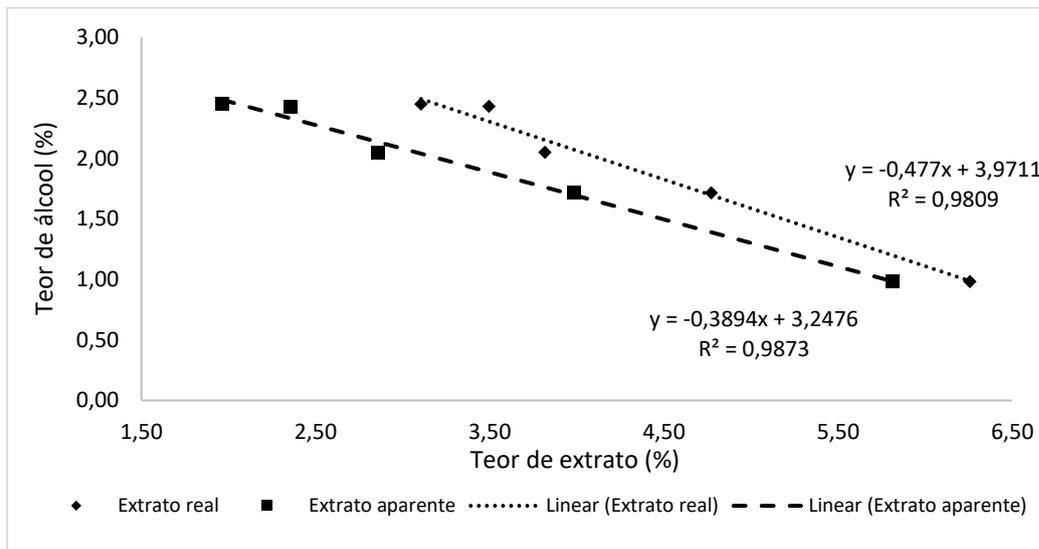
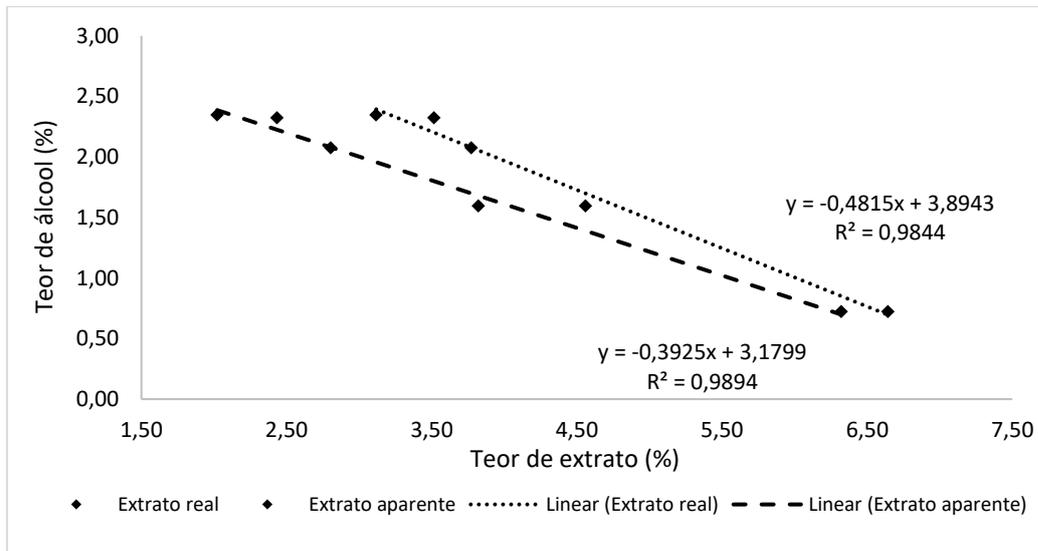


Figura 29 - Aumento do teor de álcool (P) em relação ao extrato (S) no mosto fermentado com lúpulo Cascade americano



As figuras 28 e 29 representam a quantidade de produto em relação ao substrato em relação aos primeiros 6 dias de fermentação, visto que diante deste dia os valores são equivalentes e não representam uma diferença estatística. A equação obtida com a linha de tendência traçada representa a quantidade de produto que se produziu a partir de uma dada quantidade de substrato, o que pode ser relacionado com a equação 14, onde o rendimento $Y_{P/S}$ é o coeficiente angular da equação linear apresentada nos gráficos das figuras 28 e 29.

Segundo HADWICK (1994), outra maneira de calcular o rendimento da fermentação pode ser expresso pela equação 16, a qual mensura a quantidade de extrato fermentado e é descrito pelo método prescrito pela *American Society of Brewing Chemists*. Nesta equação, a variável O é o valor do extrato original e a E é o extrato real. Os valores calculados estão representados na tabela 12. De acordo com o mesmo autor, uma faixa esperada para leveduras lager está entre 60 – 70%. Durante o experimento utilizamos uma levedura ale, da qual espera-se um rendimento semelhante ao das leveduras lager. Os valores obtidos de rendimento médio ao longo da fermentação estão dentro da faixa normal para ambos os ensaios.

$$RDF, \% = \frac{(O-E)}{O} \times \frac{1}{1-(0,005161 \times E)} \times 100 \quad (16)$$

Tabela 13 - RDF (grau real de fermentação) dos ensaios feitos com lúpulo Cascade brasileiro e lúpulo Cascade americano ao longo da fermentação

Tempo (dias)	Lúpulo Cascade brasileiro	Lúpulo Cascade americano
1	24,48	18,29
2	42,56	41,92
3	52,54	53,18
4	59,12	57,73
6	61,94	60,88
7	61,44	60,22
8	61,27	60,68
9	61,72	63,99
10	61,49	60,83
11	60,99	61,25
12	62,53	61,13
13	61,73	60,87
14	61,61	60,55
15	61,40	60,44
16	61,36	61,05
17	64,52	61,31
18	61,72	61,48
19	62,09	61,32
20	61,72	61,02
21	61,82	61,11
Média	61,83	61,13

5.3.3. Concentração de iso- α -ácidos

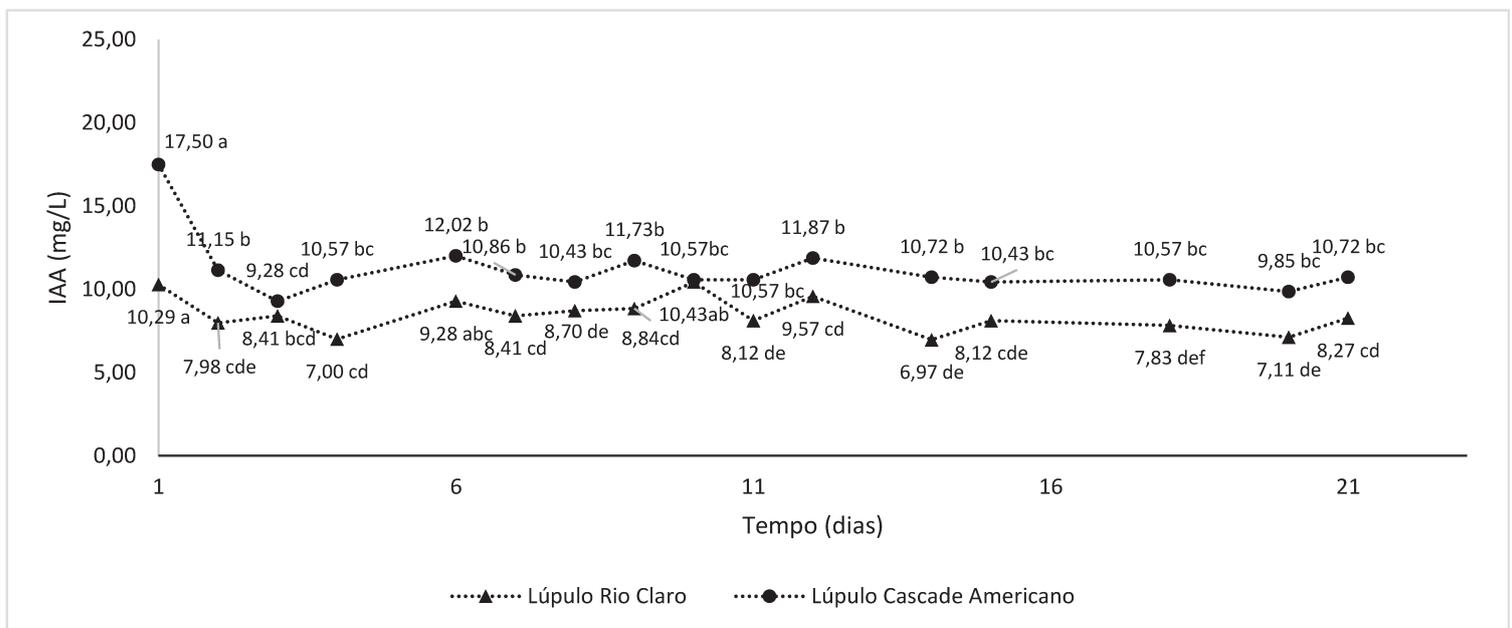
Durante a fermentação a levedura desempenha um metabolismo secundário, o qual é responsável pela produção de diversos compostos de sabor e aroma e o que caracteriza o perfil sensorial do produto final. Sendo assim, ao longo do processo fermentativo as leveduras podem utilizar diversos compostos produzidos por elas mesmas, como álcoois superiores, como substratos para a conversão em outros compostos aromáticos. Além disso, podem consumir compostos provenientes do lúpulo, como os óleos essenciais ou os ácidos. Contudo, no presente trabalho analisou-se a concentração de iso- α -ácidos ao longo da fermentação e os dados estão apresentados na figura 30 (WILLAERT, 2012).

De acordo com os dados obtidos durante os 21 dias de fermentação, pode-se observar uma queda significativa na concentração de iso- α -ácidos nos primeiros dias de fermentação, o que pode ser explicado pelo metabolismo acelerado das leveduras neste período. Este mesmo resultado foi encontrado por Leme e Schmidt (2017) que encontraram uma queda significativa nos valores de amargor no período inicial da fermentação. Com o objetivo de saber a diferença

estatística entre os dias de fermentação, aplicou-se a ANOVA ($p < 0,05$) e Tukey. Entretanto, não há constância entre os dados, como observado. Este fato pode ser explicado por um erro experimental, ao passo que, ao colher as amostras não houve homogeneização do mosto, ocasionando assim, uma diferença entre as amostras da concentração desse composto que pode não ser causada pelo metabolismo das leveduras. Todavia, não se pode afirmar que houve estabilização na concentração após o final da fermentação.

A degradação dos iso- α -ácidos ao longo do período de estocagem da cerveja foi estudada por Kaltner e Mitter (2009), que encontraram uma degradação entre 10 e 15% através do período de estocagem em relação à concentração inicial. Com isso, ao calcular-se a degradação desses compostos no período da fermentação tomando como concentração inicial no primeiro dia e a final no sexto dia, o qual foi identificado como último dia de fermentação. Sendo assim, o lúpulo Cascade brasileiro possui uma concentração inicial de iso- α -ácido de 10,29 mg/l no primeiro dia de fermentação e 9,28 mg/l no sexto dia de fermentação, a degradação foi cerca de 10%. Enquanto o lúpulo *Cascade* americano possui concentração inicial de 17,5 mg/l e no sexto dia 12,02 mg/l, sendo então uma degradação de 31,32%. Ao comparar esses dados com os obtidos por Kaltner e Mitter (2009), percebe-se que o lúpulo em pellet (lúpulo *Cascade* americano) teve uma degradação duas vezes maior. Este fato pode ser explicado pela maior disponibilidade e solubilidade dos componentes presentes no *pellet*.

Figura 30 - Concentração de iso-alfa-ácido ao longo da fermentação



6. CONCLUSÃO

O lúpulo Cascade brasileiro possui composição semelhante a outros lúpulos comerciais da mesma variedade, com conseqüente potencial para a utilização na produção de cervejas artesanais. A ampliação de sua produção pode reduzir o valor de produção da cerveja e também aumentar a qualidade desta, já que o lúpulo fresco possui menores perdas dos compostos desejados. Para tal é importante que se adotem boas práticas de fabricação deste insumo, no sentido de padronizar sua produção.

Os dados obtidos da concentração de α -ácidos ao longo da isomerização demonstraram a diferença entre a solubilidade dos α -ácidos provenientes de diferentes formas de lúpulo. Sendo o extrato a forma que possui maior solubilização destes, enquanto o lúpulo em flor possuiu os menores valores. Essa informação é importante, pois o produtor de cerveja brasileiro não está acostumado a usar as flores de lúpulo como ingrediente.

Em relação à reação de isomerização, percebeu-se uma tendência a uma cinética de primeira ordem, como observado por outros autores. Além disso, a concentração de iso- α -ácido no mosto fermentado com o lúpulo em flor obteve valores abaixo do encontrado na literatura, o que demonstra seu baixo potencial de utilização.

Ao longo da fermentação desenvolvida, observou-se a perda de amargor representada pela concentração de iso- α -ácidos. Este fenômeno ocorreu principalmente durante o período exponencial da cinética de fermentação das leveduras e deve ser levado em conta na dosagem do ingrediente.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ao desenvolver o projeto de mestrado observou-se algumas possibilidades para a realização de trabalhos futuros como continuação do presente trabalho. Para se obter maior controle dos componentes do lúpulo e sua vida de prateleira, pode-se fazer ensaios durante o período de estocagem para monitorar a perda de ácidos amargos. Além disso, sugere-se a modelação da reação cinética de isomerização em relação à temperatura, como na etapa de resfriamento do mosto, já que a isomerização ocorre mesmo em temperaturas inferiores à 100 °C, como observado por Jaskula et al. (2008).

Por fim, na etapa de fermentação podem ser trabalhados os óleos essenciais e os ácidos amargos em relação à biotransformação realizada pelas leveduras durante o processamento.

Assim, obter-se-á maiores informações a respeito do decaimento do amargor observado neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABRABE (Associação Brasileira de Bebidas). Categorias de Mercado. Disponível em: <http://www.abrabe.org.br/categorias/> Acesso em: 20 de set. 2016.
- ALMAGUER, C. et al. Humulus lupulus - a story that begs to be told. A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 4, p. 289–314, 2014.
- ASKEW, H. O. CHANGES IN HOP α ACIDS CONCENTRATIONS ON HEATING IN AQUEOUS SOLUTIONS AND UNHOPPED WORTS. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 70, n. 6, p. 503–513, 1964.
- BOULTON, C. A. **Encyclopedia of Brewing**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
- BOULTON, C. A.; QUAIN, D. E. Brewing Yeast. **Brewing Yeast and Fermentation**, n. 1 956, p. 143–259, 2001a.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. Fermentation Management. **Brewing Yeast and Fermentation**, p. 377–467, 2001b.
- BOULTON, C.; QUAIN, D. The Biochemistry of Fermentation. **Brewing Yeast and Fermentation**, p. 69–142, 2001c.
- BRIGGS, D. E. et al. **Brewing: Science and Practice (Google eBook)**. [s.l.: s.n.].
- CABALLERO, I.; BLANCO, C. A.; PORRAS, M. Iso- α -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. **Trends in Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 21–30, 2012.
- COOK, A. H. **The Chemistry and Biology of yeasts**. [s.l.: s.n.].
- DE KEUKELEIRC, D. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Quimica Nova**, v. 23, n. 1, p. 108–112, 2000.
- ESSLINGE, H. M. Fermentation, Maturation and Storage. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**, p. 207–224, 2009.
- HARDWICK, W. Handbook of Brewing. v. 15, p. 728, 1994.
- HORNSEY, Ian S. (Ian Spencer). **Brewing**. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 1999. 231 p., il. (RSC paperbacks). ISBN 0854045686 (broch.).
- HUANG, Y.; TIPPMANN, J.; BECKER, T. Kinetic Modeling of Hop Acids during Wort Boiling. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 1, p. 47–52, 2013.
- JASKULA, B. et al. A Kinetic Study on the Isomerization of Hop α -Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 6408–6415, 2008.

KROTTENTHALER, M. Ch 03 Hops. **Handbook of Brewing. Processes, Technology, Markets**, 2009.

MARKG.MALOWICKI. Hop Bitter Acid Isomerization and Degradation Kinetics in a Model Wort-Boiling System. 2004.

SHARP, D. C. (DANIEL C.; COLLIER), D. C. (DANIEL. Factors that Influence the Aroma and Monoterpene Alcohol Profile of Hopped Beer. 2016.

STEVENS, R. The Chemistry of Hop Constituents. **Brewing Industry Research Foundation**, n. 1, p. 19–65, 1966.

VERZELE, M. 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing. **institute of brewing**, v. 92, p. 32–48, 1986.

WILLAERT, R. Biochemistry of Beer Fermentation. **Food Biochemistry and Food Processing: Second Edition**, p. 627–653, 2012.

APÊNDICE A

O trabalho inicial proposto teve como um dos objetivos analisar o comportamento dos ácidos amargos do lúpulo em relação à densidade do mosto e, com isso, se utilizaria uma solução tampão como simulação da densidade zero. Como Jaskula (2008) realizou a reação de isomerização em solução tampão produzida a partir de ácido 3,3-dimetil glutárico, optou-se por realizar um ensaio com este. Em comparação, foi feito outro experimento utilizando solução tampão de ácido cítrico e citrato a fim de analisar se há alteração na reação de isomerização ao mudar o meio, sendo ambas as soluções com pH 5,2.

Tabela 14 - Resultados de concentração (média \pm desvio padrão) de humulonas em tampão ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura.

Tempo de fervura (min)	Cohumulona (mg/L)	n+Adlhumulona (mg/L)	α -ácidos totais (mg/L)
5	16,45 \pm 0,13	34,36 \pm 0,36	50,81 \pm 0,21
10	18,85 \pm 0,13	39,85 \pm 0,36	58,71 \pm 0,21
15	15,32 \pm 0,13	34,81 \pm 0,36	50,13 \pm 0,21
20	18,14 \pm 0,13	18,14 \pm 0,13	36,29 \pm 0,21
30	15,41 \pm 0,13	34,55 \pm 0,36	49,97 \pm 0,21
45	11,15 \pm 0,13	25,00 \pm 0,36	36,15 \pm 0,21
60	10,08 \pm 0,13	24,53 \pm 0,36	34,61 \pm 0,21
90	5,88 \pm 0,13	16,84 \pm 0,36	22,71 \pm 0,21

Figura 31 - concentrações de humulonas em tampão ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura.

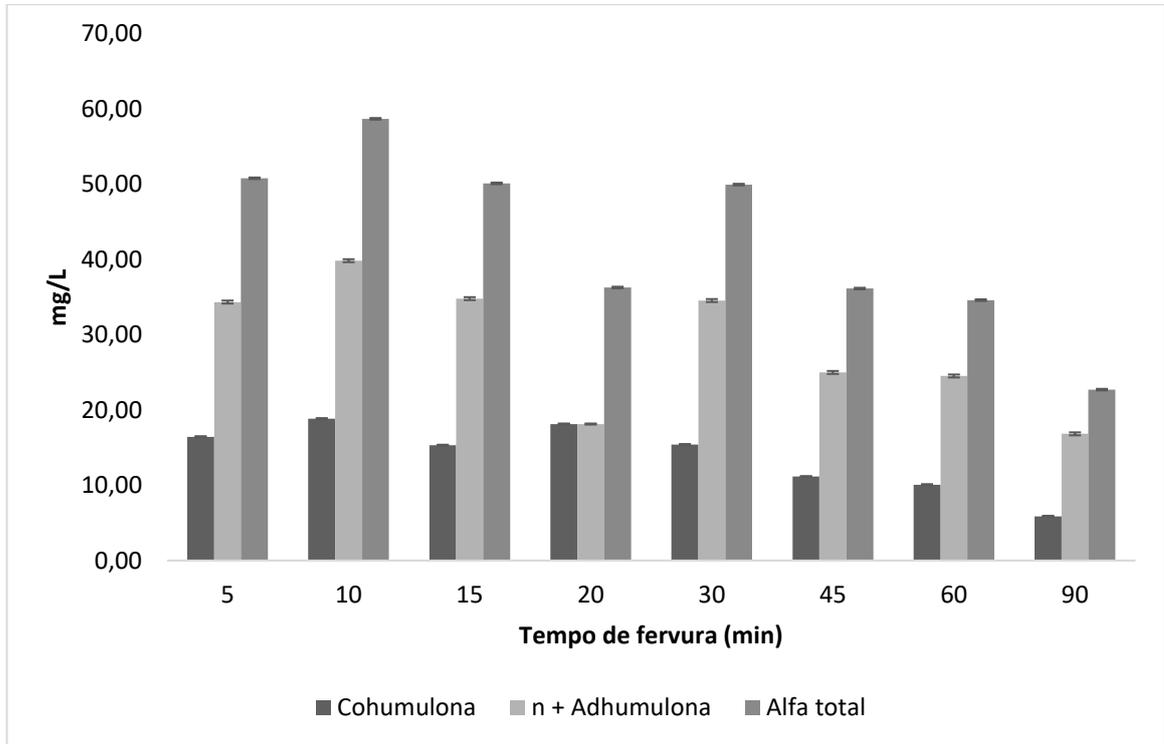
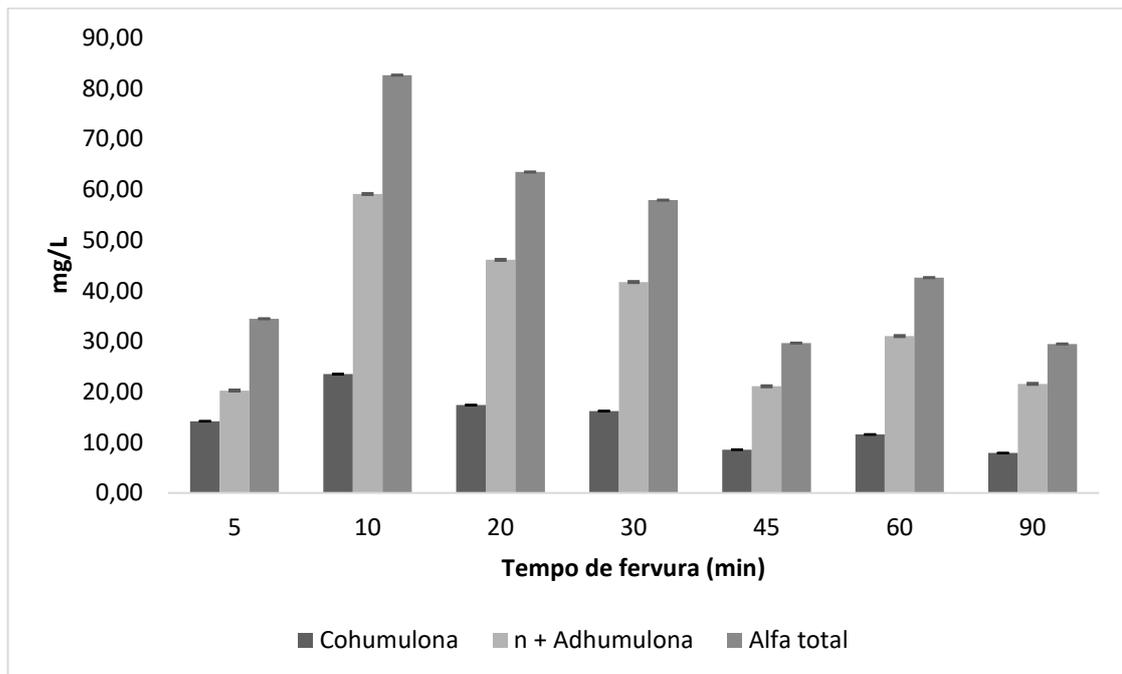


Tabela 15 - Resultados de concentração (média \pm desvio padrão) de humulonas em tampão ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura.

Tempo de fervura (min)	Cohumulona (mg/L)	n+Adlhumulona (mg/L)	α -ácidos totais (mg/L)
5	14,19 \pm 0,13	20,25 \pm 0,36	34,44 \pm 0,21
10	23,50 \pm 0,13	59,10 \pm 0,36	82,61 \pm 0,21
15*	-	-	-
20	17,37 \pm 0,13	46,08 \pm 0,36	63,45 \pm 0,21
30	16,19 \pm 0,13	41,70 \pm 0,36	57,89 \pm 0,21
45	8,54 \pm 0,13	21,09 \pm 0,36	29,63 \pm 0,21
60	11,56 \pm 0,13	31,02 \pm 0,36	42,58 \pm 0,21
90	7,89 \pm 0,13	21,57 \pm 0,36	29,46 \pm 0,21

*Não recebemos a amostra de 15 minutos de fervura.

Figura 32 - Concentrações de humulonas em tampão ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura



A tabela 13 e a figura 31 mostram os dados de humulonas solubilizadas em solução tampão com ácido 3,3-dimetil glutárico, enquanto a tabela 14 e a figura 32 mostram os dados obtidos em solução tampão produzida a partir de tampão com ácido cítrico. Primeiramente, os dados que representam *outliers* nos experimentos podem ser explicados por erro experimental ao coletar o volume das alíquotas durante a isomerização. Além disso, quando se relaciona os dados obtidos com as duas soluções, percebe-se que há diferença entre os valores obtidos. Entretanto, para uma análise mais assertiva, deverão ser realizados testes estatísticos de variância (ANOVA e Tukey) a fim de se obter a diferença estatística entre os tratamentos.

Tabela 16 - Resultados de concentração (média \pm desvio padrão) de iso-humulonas em tampão ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura.

Tempo de fervura (min)	Iso-Cohumulona (mg/L)	Iso-n+Adlhumulona (mg/L)	Iso- α -ácidos totais (mg/L)
5	1,91 \pm 0,16	2,18 \pm 0,30	4,09 \pm 0,35
10	4,37 \pm 0,15	4,46 \pm 0,30	8,83 \pm 0,33
15	6,25 \pm 0,15	6,63 \pm 0,29	12,88 \pm 0,32
20	10,76 \pm 0,13	10,76 \pm 0,13	21,53 \pm 0,19
30	13,53 \pm 0,13	13,88 \pm 0,26	27,40 \pm 0,29
45	18,38 \pm 0,13	19,68 \pm 0,24	38,05 \pm 0,27
60	28,29 \pm 0,15	30,95 \pm 0,23	59,24 \pm 0,15
90	32,07 \pm 0,16	36,94 \pm 0,25	69,01 \pm 0,16

Figura 33 - Concentrações de iso-humulonas em tampão de ácido glutárico conforme diferentes tempos de fervura

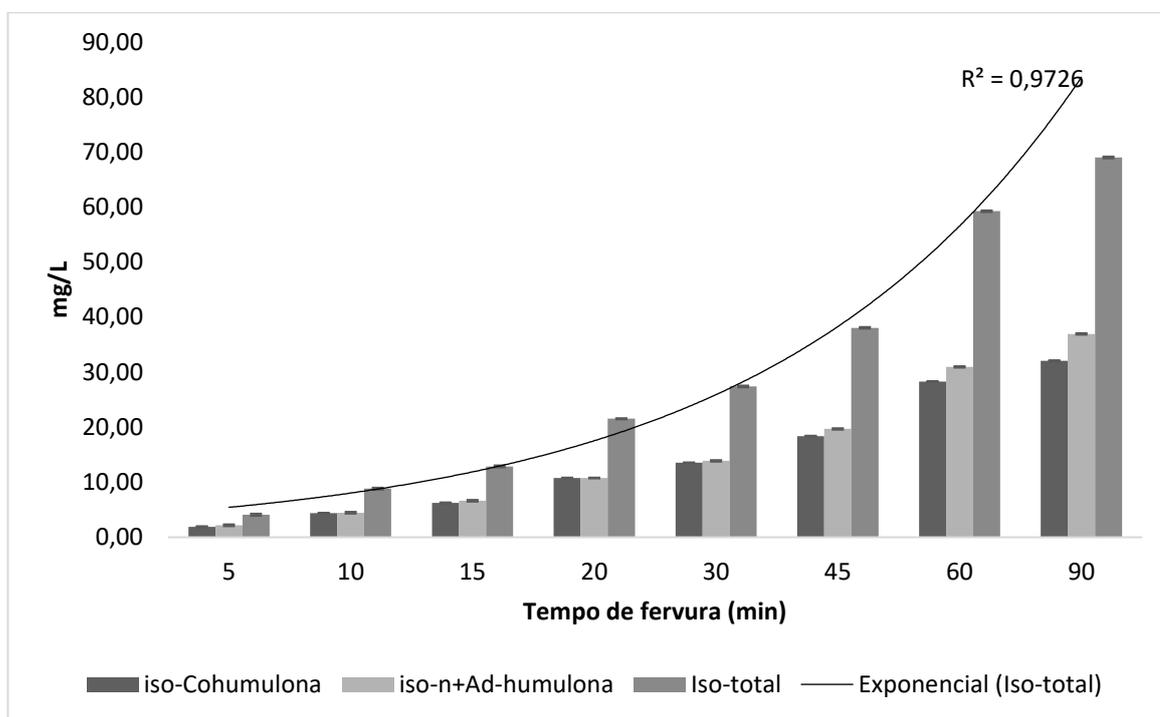
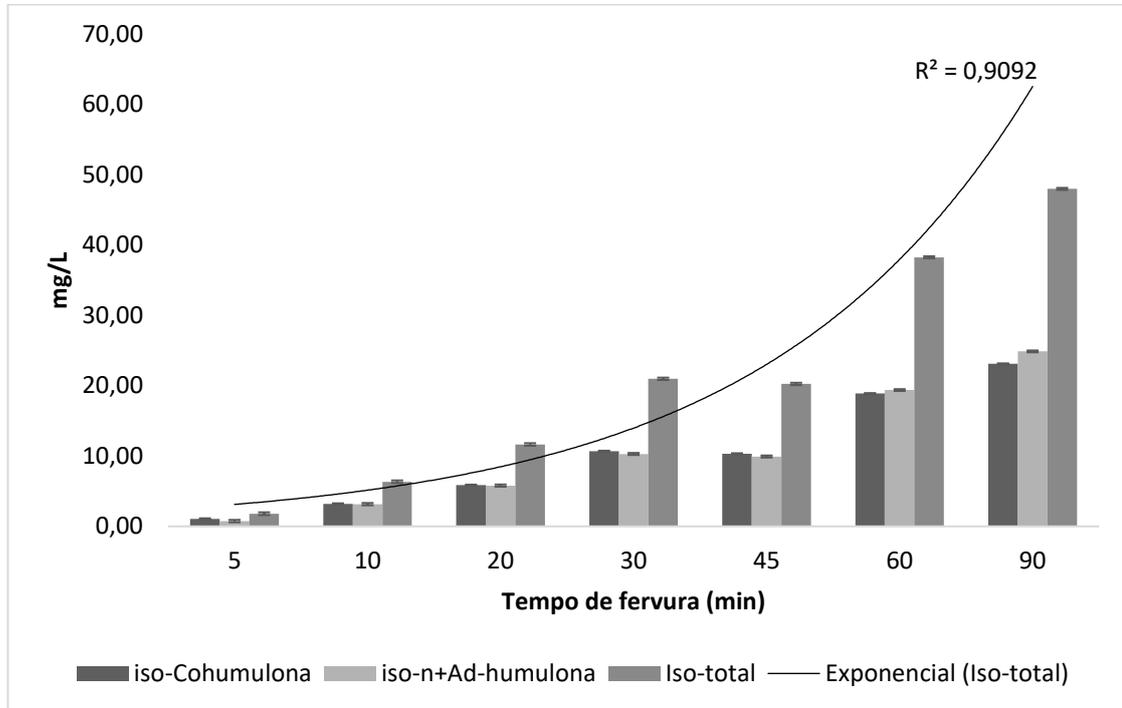


Tabela 17 - Resultados de concentração (média ± desvio padrão) de iso-humulonas em tampão ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura.

Tempo de fervura (min)	Iso-Cohumulona (mg/L)	Iso-n+Adlhumulona (mg/L)	Iso- α -ácidos totais (mg/L)
5	1,05±0,16	0,75±0,31	1,80±0,31
10	3,19±0,16	3,16±0,30	6,35±0,31
15	-	-	-
20	5,85±0,15	5,80±0,29	11,65±0,31
30	10,69±0,13	10,29±0,27	20,98±0,31
45	10,32±0,13	9,93±0,27	20,25±0,31
60	18,88±0,13	19,38±0,24	38,25±0,31
90	23,10±0,13	24,87±0,24	47,97±0,31

Figura 34 - Concentrações de iso-humulonas em tampão de ácido cítrico conforme diferentes tempos de fervura



Ao se observar as tabelas 15 e 16 e as figuras 33 e 34, os quais representam a concentração de iso- α -ácidos das soluções de ácido 3,3-dimetil glutárico e ácido cítrico, respectivamente, percebe-se que a tendência exponencial da reação cinética de isomerização é semelhante. Entretanto, os valores obtidos com a solução de ácido 3,3-dimetil glutárico são superiores aos obtidos com a solução de ácido cítrico. Como no caso das humulonas, para se obter uma análise mais assertiva dessa diferença, deve-se realizar as análises estatísticas para saber se há diferença entre os tratamentos.

Estes dados serão analisados estatisticamente e com mais afinco para a utilização em trabalhos futuros.

APÊNDICE B

Tabela 18 - Concentrações utilizadas para construir as curvas de calibração para quantificação de humulonas

Analito	1 (mg/L)	2 (mg/L)	3 (mg/L)	4 (mg/L)	5 (mg/L)
Total de α -ácidos	4,8	15,8	62,6	108,3	153,6
Cohumulona	1,5	4,9	19,5	33,7	47,8
n + Adhumulona	3,3	10,9	43,2	74,6	105,9

Figura 35 - Curva de calibração da cohumulona

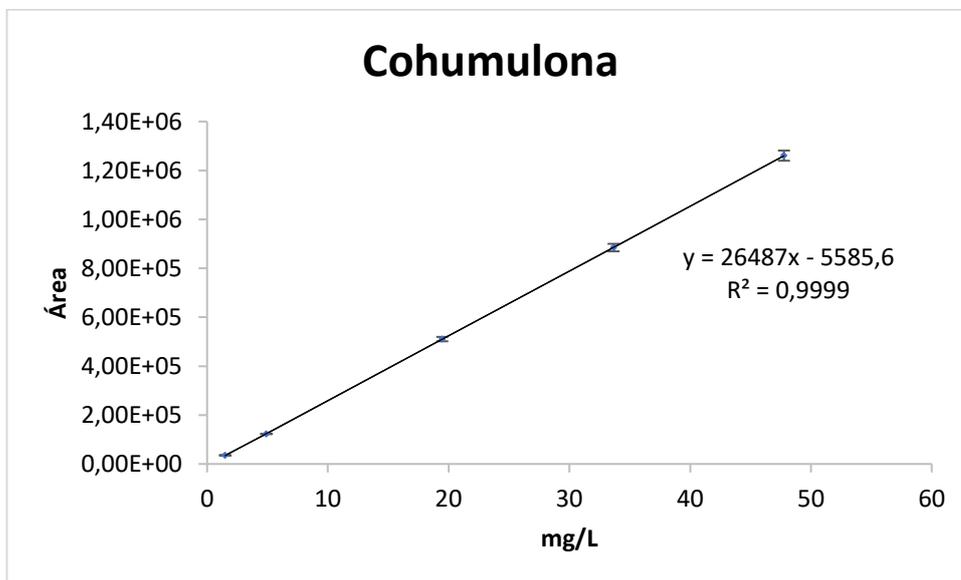


Figura 36 - Curva de calibração da Humulona+adhumulona

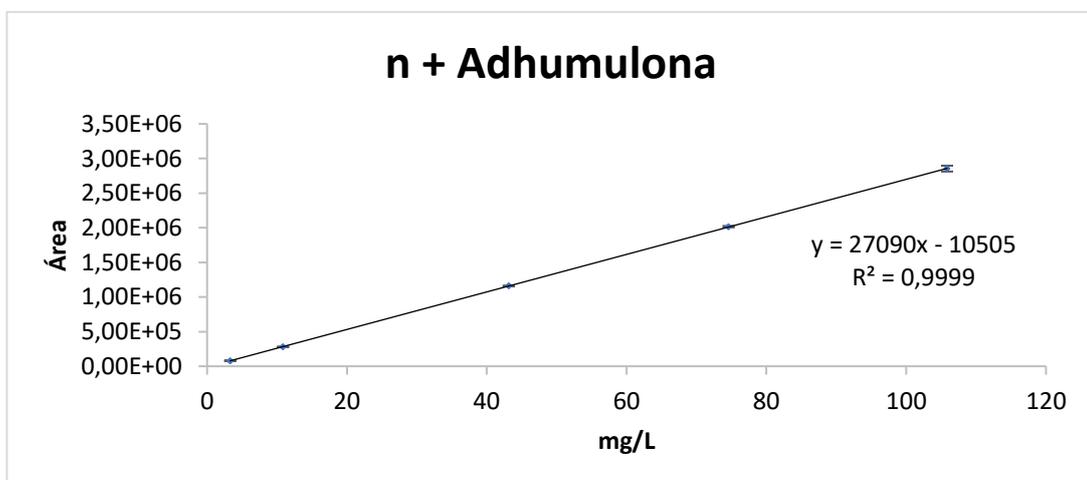


Tabela 19 - Figuras de mérito de faixa linear, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para humulonas.

Analito	r	Faixa linear (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Cohumulona	0,9999	1,5 – 47,8	0,27	0,90
Humulona+adhumulona	0,9999	3,3 – 105.8	0,74	2,47

Tabela 20 - Concentrações utilizadas para construir as curvas de calibração para quantificação de iso-humulonas e iso-lupulonas.

Analito	Diluição 1 (mg/L)	Diluição 2 (mg/L)	Diluição 3 (mg/L)	Diluição 4 (mg/L)	Diluição 5 (mg/L)
Total de iso	2,2	22,7	43,3	63,1	84,0
Iso-Cohumulona	0,9	9,1	17,3	25,2	33,6
Iso-n+Adhumulona	1,3	13,6	26,0	37,9	50,4

Figura 37 - curva de calibração da iso-cohumulona

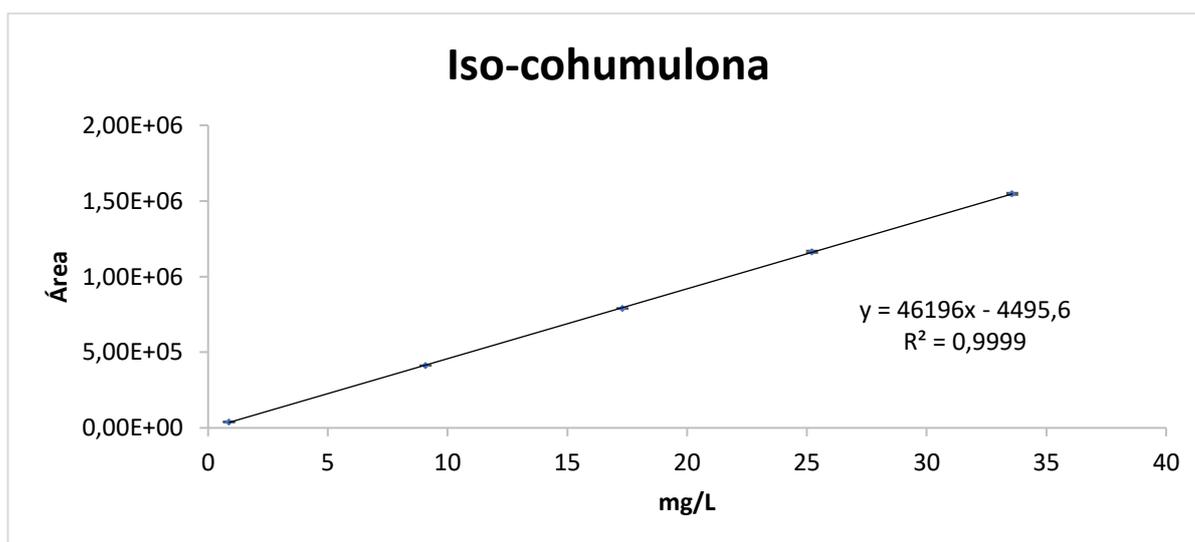
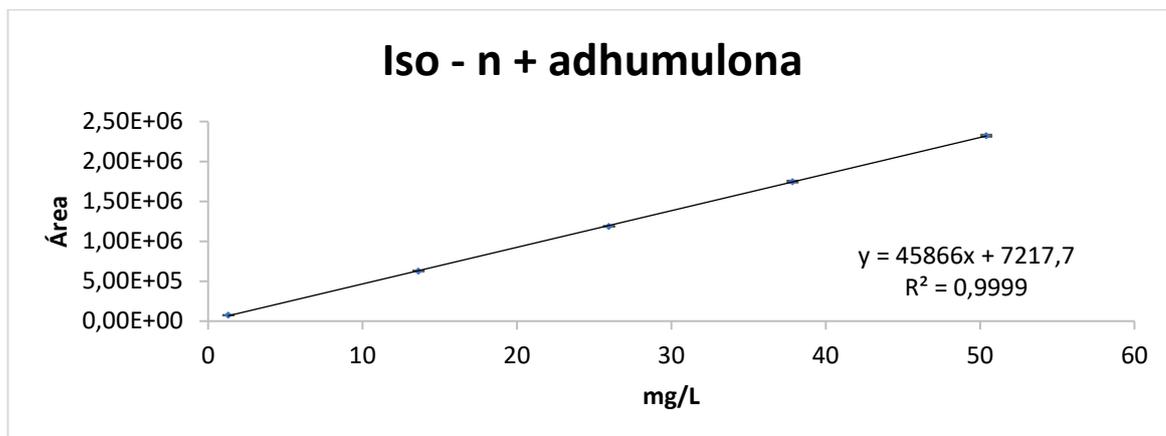


Figura 38 - curva de calibração da iso-n+adhumulona**Tabela 21** - Figuras de mérito de faixa linear, limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para iso-humulonas.

Analito	r	Faixa linear (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
Iso - cohumulona	0,9999	0,87- 33,5	0,32	0,85
Iso - n + adhumulona	0,9999	1,3 - 50,4	0,27	1,25