

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**Estudo da cinética bioquímica e sensorial de  
diferentes tipos de cervejas brasileiras**

PRISCILA BECKER SIQUEIRA

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. GABRIELA ALVES MACEDO

Orientadora

Profa. Dra. HELENA MARIA ANDRÉ BOLINI

Co-orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos  
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção  
do título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas - SP  
2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

Si75e Siqueira, Priscila Becker  
Estudo da cinética bioquímica e sensorial de diferentes tipos de cervejas brasileiras / Priscila Becker Siqueira. – Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Gabriela Alves Macedo  
Co-orientador: Helena Maria André Bolini  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Cerveja. 2. Envelhecimento. 3. Capacidade antioxidante. 4. Compostos fenólicos. 5. Análise sensorial.  
I. Macedo, Gabriela Alves. II. Bolini, Helena Maria André. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV. Título.

(ckn/fea)

Titulo em ingles: Study of biochemical and sensorial cinetic of different types of  
brazilian beer

Palavras-chave em inglês (Keywords): Beer, Aging, Antioxidant capacity, Phenolic  
compounds, Sensory analysis

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora: Gabriela Alves Macedo

João Batista de Almeida e Silva

Regina Noronha

Marcelo Prado

Programa de Pós-Graduação: Programa em Ciência de Alimentos

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Gabriela Alves Macedo  
(orientadora)

---

Profa. Dra. Regina Lúcia F. de Noronha

---

Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva

---

Prof. Dr. Marcelo Prado



"As paixões são como ventanias que enfunam as velas dos navios, fazendo-os navegar; outras vezes podem fazê-los naufragar, mas se não fossem elas, não haveria viagens nem aventuras nem novas descobertas."

Voltaire



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar todos os meus passos;

À minha querida professora, Dra. Gabriela Alves Macedo, por sua excelente orientação, confiança, paciência e amizade;

À Dra. Helena Maria André Bolini, pela disponibilidade e atenção dispensadas durante este trabalho, e pelos preciosos ensinamentos em análise sensorial;

Ao meu esposo Nielsen, grande amor da minha vida, por sua paciência, incentivo, compreensão, e sobretudo por seu incomparável amor;

Ao meu pai, Vitor Siqueira (*in memoriam*), por seu exemplo de caráter e bondade incondicional, e por nunca ter me deixado desistir dos meus sonhos;

À minha mãe, Anésia, por sua alegria e motivação, por sua presença sempre constante e pela confiança depositada;

Aos meus irmãos Nilcéia e Samuel, meu sobrinho Marcelo e a toda minha família, por acreditarem em mim e estarem sempre presentes;

Aos amigos Carlos Alexandre e Bianca, pela essencial ajuda durante os testes sensoriais. Sem vocês não teria sido possível...

A toda equipe de provadores, que foi sempre fiel à sua dose diária de cerveja!

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica, por todas as risadas compartilhadas, pela companhia nos finais de semana, pelas deliciosas receitas que experimentamos juntos, e principalmente pela amizade dedicada;

Às técnicas dos Laboratórios de Bioquímica e Análise Sensorial, Bia, Priscila e Lia, por todo o apoio e incentivo na realização da parte prática deste trabalho;

Ao Engenheiro Gabriel Galembeck, pela instrução e esclarecimento sobre o processamento da cerveja;

Ao amigo e estatístico, Leonardo R. Alves, pelos inúmeros e-mails trocados e essencial ajuda no tratamento estatísticos dos dados;

À Dra. Ana Lúcia S. C. Lemos, por fazer despertar em mim o desejo e a coragem de me dedicar à ciência;

Aos professores da FEA que contribuíram significativamente para minha formação como engenheira de alimentos;

À Banca Examinadora pelas correções e sugestões preciosas.

Aos grandes compositores, principalmente Bach, Beethoven e Mahler, por tornarem mais agradáveis todos os momentos dedicados a este trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Por todas as amizades que nasceram nesta etapa, e aos grandes e velhos amigos, que direta ou indiretamente me incentivaram e contribuíram para tornar possível a realização deste trabalho!

## RESUMO

Cerveja é a bebida obtida através da fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, geralmente malte de cevada, sendo facultativo a adição de outra matéria-prima, como milho, arroz ou trigo, e possui em geral teor alcoólico baixo, entre 3% e 8%. A cerveja pode ser considerada uma boa fonte de polifenóis, que podem ser provenientes tanto do malte quanto do lúpulo. Devido à sua capacidade antioxidante e baixo teor alcoólico, é capaz de melhorar a atividade antioxidante do plasma, reduzindo o risco de doenças coronarianas, sem apresentar os aspectos negativos produzido por altas doses de etanol. A cerveja é um produto instável, que passa por diversas transformações químicas, físicas e sensoriais durante sua vida de prateleira. Este estudo teve por objetivo a avaliação do perfil oxidativo de três tipos diferentes de cerveja durante sua vida de prateleira, analisado através de testes bioquímicos e sensoriais. As amostras foram envelhecidas de modo natural (4 meses) e forçado (6 dias a 42°C), e as análises para obtenção do perfil bioquímico e sensorial foram realizadas periodicamente durante este período. Os testes realizados foram: determinação da concentração de fenóis totais, capacidade antioxidante (DPPH, ABTS<sup>+</sup>), poder redutor e capacidade pró-oxidante (atividade redutora do cobre), análise descritiva quantitativa (ADQ) e testes afetivos. Os resultados obtidos mostraram que a concentração de compostos fenólicos diminui nas duas primeiras semanas de envelhecimento e se mantém constante após este período. A capacidade antioxidante da cerveja apresenta queda de até 50% de seu valor inicial durante a estocagem. Os testes bioquímicos realizados com as cervejas submetidas ao envelhecimento forçado não apresentaram alterações na concentração de compostos fenólicos ou em sua capacidade antioxidante. Os testes descritivos indicaram aumento no aroma e sabor de papelão, que é o principal indicador sensorial do processo de oxidação da cerveja, diminuição da percepção do gosto amargo e aumento do gosto doce. A aceitação do produto foi satisfatória para todas as amostras, e não mostrou ter relação com o tipo de produto ou período de estocagem.



## ABSTRACT

Beer is a beverage obtained through alcoholic fermentation of malt wort, usually made of barley, which could be added of other cereals, such as corn, rice or wheat. Its alcoholic content is between 3% and 8%. The beer can be considered a good source of polyphenols derived both from malt or hop. Due to its antioxidant capacity and low alcoholic content, it's able to improve plasma antioxidant activity, reducing the risk of cardiovascular diseases, without the negative effects of high doses of alcohol. The beer is an unstable product that is involved in a series of chemical, physical and sensorial transformations during its shelf life. The objective of this study is to evaluate the oxidative profile of three different types of beer during their shelf life, analyzed through biochemical and sensorial assays. Samples were aged in a natural (4 months) and forced way (6 days at 42°C), and tests were performed periodically along this period. The applied tests were: Total polyphenol content, hydrogen-donating ability (DPPH), total antioxidant status (ABTS<sup>+</sup>), reducing power, copper reducing activity, quantitative descriptive analysis and consumer acceptance. Results showed that polyphenol content decreased during the first 2 weeks of aging and remained constant after that. The antioxidant capacity of beer decreased up to 50% of its initial value during the aging period. The biochemical tests applied to the beer submitted to forced aging had no changes in total polyphenol content or antioxidant capacity. The descriptive tests showed an increase in cardboard aroma and flavor, which are the most important sensorial indicators of the oxidative process in beer, a decrease in bitter taste and a higher sweet taste perception. Product acceptance was satisfactory to all samples, and it seems not to be related to the type of beer or aging period.



# Índice geral

<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
<b>2.1 A CERVEJA</b>	<b>5</b>
<b>2.2 PROCESSO</b>	<b>7</b>
2.2.1 MALTAGEM	7
2.2.2 MOAGEM DO MALTE	8
2.2.3 MOSTURAÇÃO	8
2.2.4 COZIMENTO DO MOSTO	9
2.2.5 RESFRIAMENTO	9
2.2.6 FERMENTAÇÃO	9
<b>2.3 OXIDAÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS</b>	<b>12</b>
<b>2.5 ENVELHECIMENTO</b>	<b>18</b>
<b>2.6 ANÁLISE SENSORIAL</b>	<b>23</b>
2.6.1 ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA	23
2.6.2 TESTE AFETIVO	24
<b>CAPÍTULO 3. ESTABILIDADE OXIDATIVA: ENVELHECIMENTO FORÇADO</b>	<b>27</b>
<b>3.1 MATERIAIS</b>	<b>27</b>
3.1.1 AMOSTRAS	27
3.1.2 REAGENTES	29
3.1.3 EQUIPAMENTOS	29
3.1.4 ESTRATÉGIA	29
3.1.5 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
<b>3.2 METODOLOGIA</b>	<b>30</b>
3.2.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	30
3.2.2 CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES	30
3.2.3 PODER REDUTOR	31
3.2.4 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	32
3.2.5 ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE	33
<b>3.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO</b>	<b>34</b>
<b>3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>34</b>
3.4.1 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	34
3.4.2 CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES	36
3.4.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	37
3.4.4 PODER REDUTOR	39
3.4.5 ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE	41
<b>3.5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b>	<b>43</b>

**CAPÍTULO 4. ESTABILIDADE OXIDATIVA: ENVELHECIMENTO NATURAL** **45**

<b>4.1</b>	<b>MATERIAIS</b>	<b>45</b>
4.1.1	AMOSTRAS	45
4.1.2	REAGENTES	47
4.1.3	EQUIPAMENTOS	47
4.1.4	ESTRATÉGIA	47
4.1.5	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	48
<b>4.2</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>48</b>
4.2.1	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	48
4.2.2	CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES	48
4.2.3	PODER REDUTOR	50
4.2.4	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	50
4.2.5	ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE	51
<b>4.3</b>	<b>TRATAMENTO ESTATÍSTICO</b>	<b>52</b>
<b>4.4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
4.4.1	COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	52
4.4.2	CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES	57
4.4.3	CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL	61
4.4.4	PODER REDUTOR	67
4.4.5	ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE	69
<b>4.5</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b>	<b>73</b>

**CAPÍTULO 5. ESTABILIDADE SENSORIAL** **75**

<b>5.1</b>	<b>MATERIAIS</b>	<b>75</b>
5.1.1	AMOSTRAS	75
5.1.2	ESTRATÉGIA	77
<b>5.2</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>77</b>
5.2.1	ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA	77
5.2.2	TESTE AFETIVO	81
<b>5.3</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>82</b>
5.3.1	ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA	82
5.3.2	TESTE AFETIVO	85
<b>5.4</b>	<b>DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES</b>	<b>90</b>

**CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES FINAIS** **95**

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** **97**

## Índice de Tabelas

TABELA 2.1 PRINCIPAIS COMPOSTOS FENÓLICOS ENCONTRADOS NA CERVEJA. ....	16
TABELA 2.2 PRINCIPAIS COMPOSTOS VOLÁTEIS RESPONSÁVEIS POR ALTERAÇÕES NO SABOR E AROMA, FORMADOS DURANTE O ARMAZENAMENTO DA CERVEJA.....	21
TABELA 3.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE CERVEJA A, B E C. ....	28
TABELA 3.2 CONCENTRAÇÃO TOTAL DE FENÓIS DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	34
TABELA 3.3 CONCENTRAÇÃO TOTAL DE FENÓIS DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	35
TABELA 3.4 CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	36
TABELA 3.5 CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	37
TABELA 3.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	38
TABELA 3.7 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO: COMPARAÇÃO ENTRE AS MOSTRAS A, B E C. ....	38
TABELA 3.8 PODER REDUTOR DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	39
TABELA 3.9 PODER REDUTOR DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	40
TABELA 3.10 CRAI (ÍNDICE DE ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE) DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	41
TABELA 3.11 CRAI (ÍNDICE DE ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE) DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	41
TABELA 4.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE CERVEJA A, B E C. ....	46
TABELA 4.2 CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	53
TABELA 4.3 CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	54

TABELA 4.4 CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C.....	57
TABELA 4.5 CAPACIDADE DE SEQÜESTRAR RADICAIS LIVRES DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL:COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C.....	58
TABELA 4.6 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM 1 MINUTO DE REAÇÃO DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	62
TABELA 4.7 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM 4 MINUTOS DE REAÇÃO DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	62
TABELA 4.8 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM 7 MINUTOS DE REAÇÃO DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	63
TABELA 4.9 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM 1 MINUTO DE REAÇÃO DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	63
TABELA 4.10 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM 4 MINUTOS DE REAÇÃO DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	64
TABELA 4.11 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL EM 7 MINUTOS DE REAÇÃO DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL:COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C. ....	64
TABELA 4.12 PODER REDUTOR DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C. ....	68
TABELA 4.13 PODER REDUTOR DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C.....	68
TABELA 4.14 CRAI (ÍNDICE DE ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE) DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C.....	70
TABELA 4.15 CRAI (ÍNDICE DE ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE) DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL: COMPARAÇÃO ENTRE AS AMOSTRAS A, B E C.....	71
TABELA 5.1 CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE CERVEJA A, B E C. ....	76
TABELA 5.2 DEFINIÇÃO DOS TERMOS DESCRITORES DE CERVEJA E REFERÊNCIAS.....	79
TABELA 5.3 MÉDIAS PARA OS ATRIBUTOS SENSORIAIS DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL.....	83
TABELA 5.4 MÉDIAS OBTIDAS PARA A ACEITAÇÃO DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL.....	87

## Índice de Figuras

FIGURA 2.1 ESTRUTURA QUÍMICA DE ALGUNS COMPOSTOS FENÓLICOS.....	15
FIGURA 2.2 ALTERAÇÕES SENSORIAIS DURANTE O ENVELHECIMENTO DA CERVEJA SEGUNDO DALGLIESH (1977).....	20
FIGURA 3.1 PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE O ENVELHECIMENTO FORÇADO.....	35
FIGURA 3.2 PERFIL DOS VALORES DE EC50 DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE O ENVELHECIMENTO FORÇADO.....	37
FIGURA 3.3 PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ABTS <sup>+</sup> DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE O ENVELHECIMENTO FORÇADO.....	38
FIGURA 3.4 PERFIL DO PODER REDUTOR DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO.....	40
FIGURA 3.5 PERFIL DA ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO.....	42
FIGURA 4.1 PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C.....	55
FIGURA 4.2 PERFIL DOS VALORES DE EC50 DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C.....	58
FIGURA 4.3 PERFIL DA % DE INIBIÇÃO DO RADICAL DPPH DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL. (A) AMOSTRA A, (B) AMOSTRA B, (C) AMOSTRA C.....	60
FIGURA 4.4 PERFIL DA CONCENTRAÇÃO DE ABTS <sup>+</sup> DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL DAS AMOSTRAS A, B E C.....	65
FIGURA 4.5 PERFIL DO PODER REDUTOR DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL.....	69
FIGURA 4.6 PERFIL DA ATIVIDADE REDUTORA DO COBRE DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL, MEDIDA ATRAVÉS DA CONCENTRAÇÃO DE CU <sup>+</sup> .....	71
FIGURA 5.1 REFERÊNCIAS UTILIZADAS NA ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA.....	80
FIGURA 5.2 CABINE UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	80
FIGURA 5.3 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS DOS TERMOS AVALIADOS PARA AS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO NATURAL.....	84

FIGURA 5.4 PERFIL DOS CONSUMIDORES QUE PARTICIPARAM DO TESTE AFETIVO.....	86
FIGURA 5.5 FIGURA BIDIMENSIONAL DO MAPA INTERNO DE PREFERÊNCIA.....	88
FIGURA 5.6 DISTRIBUIÇÃO DA FREQUÊNCIA DAS NOTAS CORRESPONDENTES À ESCALA UTILIZADA PARA AVALIAÇÃO DA INTENÇÃO DE COMPRA DAS AMOSTRAS A, B E C DURANTE ENVELHECIMENTO FORÇADO.....	90
FIGURA 5.7 PERFIL DOS DESCRITORES SENSORIAIS DURANTE O PERÍODO DE ENVELHECIMENTO DA CERVEJA. ....	91
FIGURA 5.8 CORRELAÇÃO ENTRE SABOR DE PAPELÃO E PROPRIEDADE BIOQUÍMICAS DAS AMOSTRAS DE CERVEJA A, B E C. ....	93

## Lista de Abreviaturas

ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-sulfonato)

ACP – Mínima diferença significativa

ASE – Ácido ascórbico equivalente

BU – Unidade de amargor

CRAI – Índice da atividade redutora do cobre

DDTC – Dietiltiocarbamato de sódio cristalino

DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EBC – European Brewery Convention

EC50 – Volume de amostra necessária para reduzir 50% do radical DPPH

MDS – Mínima diferença significativa

PVPP - Polivinilpolipirrolidona



## **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO**

Genericamente, define-se cerveja como uma bebida carbonatada de baixo teor alcoólico, preparada a partir de malte de cevada, lúpulo, fermento e água de boa qualidade, permitindo-se ainda o uso de outras matérias primas como arroz, milho e trigo (Almeida e Silva, 2005).

Não se sabe ao certo a origem das primeiras cervejas, porém autores como Kunze (1996) e Aquarone *et al.* (1983) acreditam que a prática da cervejaria tenha se originado na região da Mesopotâmia, onde como no Egito, a cevada cresce em estado selvagem. Há evidências de que a cerveja feita de cevada maltada já era consumida na Mesopotâmia em 6.000 a.C., e que a cerveja nesta época não era usada somente na dieta, mas também exercia função cosmética e medicinal.

O Brasil produz, em volume, 8,5 bilhões de litros anuais, perdendo apenas para a China (27 bilhões de litros/ano), Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano), Alemanha (10,5 bilhões de litros/ano) e Rússia (9 bilhões de litros/ano),

sendo o consumo per capita no Brasil o nono maior do mundo, com uma média de 51,2 litros/ano por habitante (Sindicerv, 2006).

Do ponto de vista nutricional, a cerveja contém quantidades significativas de vitaminas do complexo B, principalmente folatos e riboflavina, e selênio. A capacidade antioxidante da cerveja é comparável à do vinho branco, mas inferior à do vinho tinto, além de possuir compostos antioxidantes diferentes, devido à composição do malte e do lúpulo diferir da composição das uvas (Lugasi, 2003).

A cerveja é a fonte de prenilflavonóis mais importante da dieta (Stevens *et al.*, 1999). Prenilflavonóis são compostos metabólitos presentes no lúpulo, responsáveis por vários efeitos biológicos. Sua composição depende da variedade de lúpulo utilizada, e das condições de maturação e estocagem (Biendl, 2002). Segundo estudo realizado por Gorinstein *et al.* (2000), a concentração de procianidinas, epicatequinas e ácido ferúlico é significativamente maior na cerveja quando comparada ao vinho branco, conferindo à cerveja maior capacidade antioxidante.

Devido à sua capacidade antioxidante e baixo teor alcoólico, a cerveja é capaz de melhorar a atividade antioxidante do plasma, reduzindo o risco de doenças coronarianas, sem apresentar os aspectos negativos produzido por altas doses de etanol (Ghiselli *et al.*, 2000). Portanto, o consumo moderado de cerveja com alta concentração de compostos antioxidantes é capaz de influenciar positivamente o nível de lipídeos do plasma e sua capacidade anticoagulante (Gasowski *et al.*, 2004).

Por ser uma bebida delicada, que possui um complexo sistema de sabor e aroma, é quimicamente instável e sofre diversas reações químicas e enzimáticas durante seu processamento e estocagem. O equilíbrio de seus compostos voláteis e não-voláteis é responsável pela aceitação e qualidade da bebida. A composição em ésteres, aldeídos, dicetonas vicinais, ácidos orgânicos, álcoois superiores, fenóis, iso- $\alpha$ -ácidos e outros compostos estão diretamente relacionados com a qualidade. A perda de qualidade pelo surgimento de sabores e aromas

indesejáveis e alterações nas propriedades físicas da cerveja é um problema que a indústria cervejeira procura solucionar (Araújo, Silva e Minim, 2003).

A análise sensorial é uma ferramenta de grande importância, pois permite a correlação entre a composição química e percepção sensorial de um alimento. Dentre os diferentes tipos de testes sensoriais a Análise Descritiva Quantitativa apresenta-se como uma metodologia que proporciona a obtenção de uma completa descrição de todas as propriedades sensoriais de um produto, representando um dos métodos mais completos e sofisticados para a caracterização sensorial de atributos importantes, enquanto os testes afetivos podem indicar se a aceitação do consumidor pelo produto é afetada por essas alterações em seu sabor e aroma.

Foram realizados no Brasil diversos trabalhos sobre a capacidade antioxidante dos alimentos, principalmente com vinhos, frutos e sucos de fruta (Minussi *et al.*, 2003; Mamede & Pastore, 2004; Kuskoski *et al.*, 2005; Kuskoski *et al.*, 2006). No entanto há pouco relato na literatura de publicações nacionais sobre a capacidade antioxidante da cerveja (Freitas, 2006).

A carência de estudos feitos com cervejas brasileiras aliada ao crescimento da indústria cervejeira no Brasil e sua constante necessidade de implementar novas tecnologias nos levou a estudar as transformações bioquímicas e sensoriais durante o envelhecimento deste produto.



## **CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 A CERVEJA**

A origem da cerveja se perde no tempo. A maioria das bebidas elaboradas com cereais nos últimos 8000 anos é hoje considerada como cerveja. Os sumérios e egípcios produziam cervejas há mais de 5.000 anos e os babilônios já fabricavam mais de dezesseis tipos de cerveja de cevada, trigo e mel há mais de 4.000 anos antes de Cristo (Cervesia, 2006).

Foi na região da Bavária, na Alemanha, em 1516 que surgiu a primeira regulamentação do processo de fabricação de cerveja, a chamada “Lei da Pureza” instituída pelo Duque Guilherme IV da Baviera. Essa lei determinava os ingredientes que poderiam ser usados na fabricação de cerveja: malte de cevada, lúpulo, e água (Kunze, 1996).

A cerveja chegou ao Brasil em 1808, trazida pela família real portuguesa de mudança para o então Brasil colônia. Em 1836 tem-se a primeira notícia sobre a fabricação de cerveja no Brasil, publicada no *Jornal do Commercio*, Rio de Janeiro.

Dados do ano de 2002 indicam o Brasil como o quinto maior produtor de cerveja mundial, com volume de 8,5 bilhões de litros anuais, perdendo apenas para a China (27 bilhões de litros/ano), Estados Unidos (23,6 bilhões de litros/ano), Alemanha (10,5 bilhões de litros/ano) e Rússia (9 bilhões de litros/ano). Quanto ao consumo per capita, o Brasil é o nono maior consumidor, com uma média de 51,2 litros/ano por habitante (Sindicerv, 2006).

De modo geral, a cerveja pode ser dividida em dois grandes grupos: as do tipo *Ale*, dentre as quais se destacam a Porter e a Stout, e as do tipo *Lager*, como a Pilsen, a Munique e a Bock. As cervejas do tipo *Ale* são fabricadas por meio de fermentação superficial ou “alta”. São geralmente claras, com sabor pronunciado de lúpulo, ligeiramente ácidas, e seu teor alcoólico varia de 4% a 8%. O processo de fermentação ocorre entre a temperatura de 20 °C e 25 °C, com duração de 2 a 5 dias e o armazenamento entre 4,5 °C e 8 °C.

As cervejas do tipo *Lager* são as mais comuns e mais consumidas. A Pilsener ou Pilsen é uma das cervejas mais conhecidas em todo mundo. Originou-se na cidade de Pilsen em 1842, antiga Tchecoslováquia. É caracterizada por ter sabor suave, cor clara e teor alcoólico entre 4% a 5 %. As cervejas deste grupo são fabricadas por fermentação profunda ou “baixa”, através de processo lento, geralmente em torno de 5 dias.

Segundo a legislação brasileira, Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997, art.64 a art.71: “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” (Brasil, 1997).

Parte do malte de cevada pode ser substituído por outros cereais, maltados ou não, como arroz, milho, trigo, aveia, centeio ou sorgo. No entanto, para ser denominado cerveja, é necessário que a bebida possua proporção de malte de cevada maior ou igual a 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares (Brasil, 1997).

## **2.2 PROCESSO**

### **2.2.1 Maltagem**

O objetivo principal do processo de maltagem é a formação de enzimas necessárias à hidrólise dos polissacarídeos e do amido presente no grão.

Inicialmente é feita a maceração do grão, que tem um aumento do teor de umidade de 12% para aproximadamente 44%. Nesta etapa há a formação de uma série de enzimas, como a alfa e beta-amilase, que decompõem ligações alfa 1-4 da amilose e amilopectina e a dextrinase-limite, que decompõe ligações alfa 1-6. Além das enzimas amilolíticas são produzidas beta-glucanase e pentosanases que decompõem a parede celular, tornando a célula mais permeável; endopeptidases, que decompõem proteínas de alto peso molecular em peptídeos, e exopeptidases, que decompõem cadeias de peptídeos em aminoácidos. A decomposição protéica deve ser controlada, de modo que se possam obter mais produtos de alto peso molecular, que são importantes para a estabilidade da espuma e corpo da cerveja, ou aminoácidos, que são essenciais para a nutrição da levedura (Briggs, 1998).

### 2.2.2 Moagem do malte

A moagem do malte facilita a dissolução do malte na água, torna o conteúdo do grão acessível à ação enzimática e prepara a camada filtrante do mosto. A moagem não deve ser muito fina a ponto de tornar lenta a filtragem do mosto ou, ao contrário, muito grossa, o que dificultaria a hidrólise do amido.

### 2.2.3 Mosturação

Esta etapa tem por objetivo promover a hidrólise do amido a açúcares fermentescíveis (maltose, glicose e maltotrioses) juntamente com dextrinas de cadeias curtas ou longas. São extraídos aproximadamente 65 % dos sólidos totais do malte, que em suspensão em água constituirão o mosto para a fermentação da cerveja.

A mosturação pode ser de dois tipos, por infusão ou decocção. O processo por infusão é feito a partir de injeção de vapor em tanque encamisado, a uma temperatura única e sem agitação. No processo por decocção o mosto é aquecido em intervalos brandos de temperatura de 40°C a 75°C, com agitação. Quando a massa estiver a 50°C, estarão agindo as proteases, a 60–65°C, ocorre a sacarificação pela  $\beta$ -amilase e a 70-75°C, a dextrinização do amido pela  $\alpha$ -amilase. O ponto final da mosturação é a degradação do amido, que se hidrolisa a açúcares fermentescíveis como maltose, glicose e maltotrioses, além de formar dextrinas (Kunze, 1996).

O tipo de mosturação é importante para as características do produto final, como teor alcóolico, sabor e aroma, relação amargor/dulçor, textura e qualidade da espuma.

#### 2.2.4 Cozimento do mosto

Após a mosturação o mosto é separado e cozido juntamente com o lúpulo a aproximadamente 100°C. Durante esta etapa há inativação das enzimas e esterilização do mosto. As proteínas coagulam e se precipitam reagindo com os taninos, formando o trube. Há também formação de compostos responsáveis pela cor e sabor do produto, através da reação de Maillard e caramelização, e extração de compostos de amargor e aromáticos do lúpulo. Nesta etapa é possível remover, por evaporação, de compostos voláteis indesejáveis, como o dimetil sulfito (Denk, *et al.*, 2000).

#### 2.2.5 Resfriamento

O resfriamento é feito em trocadores de calor. A temperatura do mosto decresce até a temperatura de fermentação, entre 8 e 13°C. Durante o resfriamento há precipitação de complexos de proteínas com taninos, chamado de trube frio.

#### 2.2.6 Fermentação

O gênero *Sacharomyces* apresenta várias cepas, consideradas seguras e capazes de produzir dois metabólitos primários importantes: etanol e dióxido de carbono. Os dois tipos de cerveja mais importantes, *lager* e *ale*, são fermentadas com cepas de *S. uvarum* (*carlsbergensis*) e *S. cerevisiae*, respectivamente. Atualmente, taxonomistas tem designado todas as cepas empregadas na produção de cerveja como pertencentes à espécie *S. cerevisiae* (Stewart, 2000).

Após ser adicionada no mosto aerado, a levedura se reproduz rapidamente devido a alta quantidade de O<sub>2</sub> dissolvido no meio, oxidando o piruvato até CO<sub>2</sub> e água. Depois que todo o oxigênio é consumido as células de levedura passam a

utilizar o açúcar de forma anaeróbica, fermentando esses açúcares em etanol e CO<sub>2</sub>. O processo de fermentação é controlado pela concentração de etanol formado, pH do meio e quantidade de açúcar remanescente.

Os principais produtos formados durante a fermentação são etanol, glicerol, ácido láctico e dióxido de carbono, mas há a formação de vários outros compostos em baixas concentrações, resultantes do metabolismo de açúcares e aminoácidos. Podem ser formados ácidos orgânicos, como o ácido cítrico, acético, pirúvico, succínico e axaloacético; ésteres, como o acetato de isoamila e o acetato de etila; compostos sulfurados, como o dimetil sulfito e dióxido de enxofre; e outros compostos como acetaldeído, dicetonas vicinais e alguns álcoois (Stewart, 2000).

## 2.3 OXIDAÇÃO

Um antioxidante é definido por Halliwell (2002) como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações se comparada à do substrato oxidável, previne ou adia significativamente a oxidação do substrato.

Os compostos antioxidantes podem apresentar diferentes mecanismos de ação:

- Seqüestrar radicais livres;
- Inativar íons metálicos;
- Remover espécies reativas de oxigênio (EROs);
- Interromper asuma reações em cadeia;
- Seqüestrar oxigênio singlete;
- Destruir peróxidos para prevenir a formação de radicais;
- Remover oxigênio e/ou diminuir sua concentração.

Segundo seu mecanismo de ação, um antioxidante pode ser primário, quando reage com radicais lipídicos para formar produtos mais estáveis. São conhecidos como interceptores de radicais livres. Estes antioxidantes rapidamente doam um átomo de hidrogênio a um radical lipídico ou são convertidos a um produto mais estável. Inibem dois passos importantes na formação de radicais livres da oxidação lipídica, reagindo com radicais peroxila para impedir a propagação da cadeia e inibindo assim a formação de peróxidos (Equação 2.1), ou reagem com radicais alcóxila para diminuir a decomposição dos hidroperóxidos em produtos de degradação (Equação 2.2). Os principais antioxidantes presentes nesse grupo são os flavonóides, eugenol, Trolox®, carotenóides, ascorbato, tocoferol, extrato de ervas e especiarias.



O antioxidante pode ser também secundário, ou preventivo. São aqueles que reduzem a taxa de iniciação da reação em cadeia através de diferentes mecanismos como inativação de íons metálicos, decomposição de hidroperóxidos, ou seqüestro de oxigênio. Inativadores de metais ou agentes quelantes são antioxidantes preventivos, removem ou desativam íons metálicos, que agem como iniciadores ou catalizadores da decomposição de hidroperóxidos. Os antioxidantes que agem na decomposição de hidroperóxidos os transferem por redução para compostos hidroxil estáveis, enquanto os seqüestradores de oxigênio reagem com o oxigênio para diminuir o suprimento de oxigênio necessário para a autooxidação. De modo geral, os antioxidantes secundários decompõem os peróxidos em produtos finais mais estáveis. Os principais antioxidantes desse grupo são o ácido tiopropiônico e seus derivados.

O sinergista faz parte da terceira categoria de antioxidantes. Consiste em um sistema com vários componentes antioxidantes que costumam apresentar sinergismo entre as diferentes substâncias com diferentes modos de ação. Os antioxidantes sinergistas geralmente aumentam a vida dos antioxidantes primários, pois agem como doadores de hidrogênio, além de regenerar os antioxidantes primários ou inativar íons metálicos. São principalmente seqüestradores de oxigênio ou quelantes de metais. Podem agir doando átomos de hidrogênio a radicais fenoxila ou promovendo um ambiente ácido mais estável para estes antioxidantes. Os principais representantes deste grupo são os sulfitos, ácido ascórbico, polifosfatos, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido fítico, flavonóides e carotenóides.

Entre os antioxidantes presentes nas frutas, vegetais e cereais, os mais ativos e freqüentemente encontrados são os compostos fenólicos. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de seqüestrar radicais livres, principalmente as hidroxilas vicinais ligadas ao anel aromático (Decker, 1997; Galato *et al.*, 1999).

Além da propriedade seqüestrante de radicais, os compostos fenólicos podem ainda quelar metais de transição, impedindo que estes participem de reações de oxi-redução, prevenindo assim eventos oxidativos (Jacob e Burry, 1996; Frémont, 2000).

## **2.4 COMPOSTOS FENÓLICOS**

Atualmente tem-se observado o crescimento do interesse na composição fenólica de alimentos e bebidas, por parte de consumidores e produtores. Os polifenóis são os antioxidantes encontrados em maior quantidade na dieta. As principais fontes de polifenóis na dieta são sucos de fruta, vinho, chá, café, cerveja e chocolate. Estudos epidemiológicos sugerem uma relação entre alimentos ricos

em polifenóis e a prevenção de algumas doenças, como câncer, doenças cardiovasculares e inflamações (Scalbert, 2000).

As principais classes de polifenóis são definidas de acordo com seu esqueleto carbônico: ácidos fenólicos, como o ácido caféico e o ácido ferúlico ou flavonóides, como a quercetina e a catequina. A diversidade estrutural dos polifenóis torna difícil sua quantificação em alimentos. Além disso, o processamento de alimentos e bebidas pode resultar em transformações na composição destes compostos, causando um enriquecimento ou empobrecimento de compostos fenólicos no alimento processado (Scalbert, 2000).

A cerveja pode ser considerada uma boa fonte de polifenóis, pois uma quantidade considerável de compostos fenólicos é encontrada tanto no malte quanto no lúpulo (Lugasi, 2003). Cerca de 70 a 80% dos compostos fenólicos são originários do malte, enquanto 20 a 30% se originam do lúpulo. No entanto, os compostos fenólicos originários da cevada sofrem mudanças durante o processamento, e por isso não são tão bem caracterizados quanto os derivados do lúpulo (Gerhauser, 2005). A etapa de fervura provoca uma série de mudanças na composição de polifenóis do mosto, que já é bastante complexa, dificultando a predição do destino dos polifenóis desta mistura. Tal complexidade deve-se em parte à facilidade de oxidação e polimerização de vários compostos fenólicos (Keukeleire, 1999).

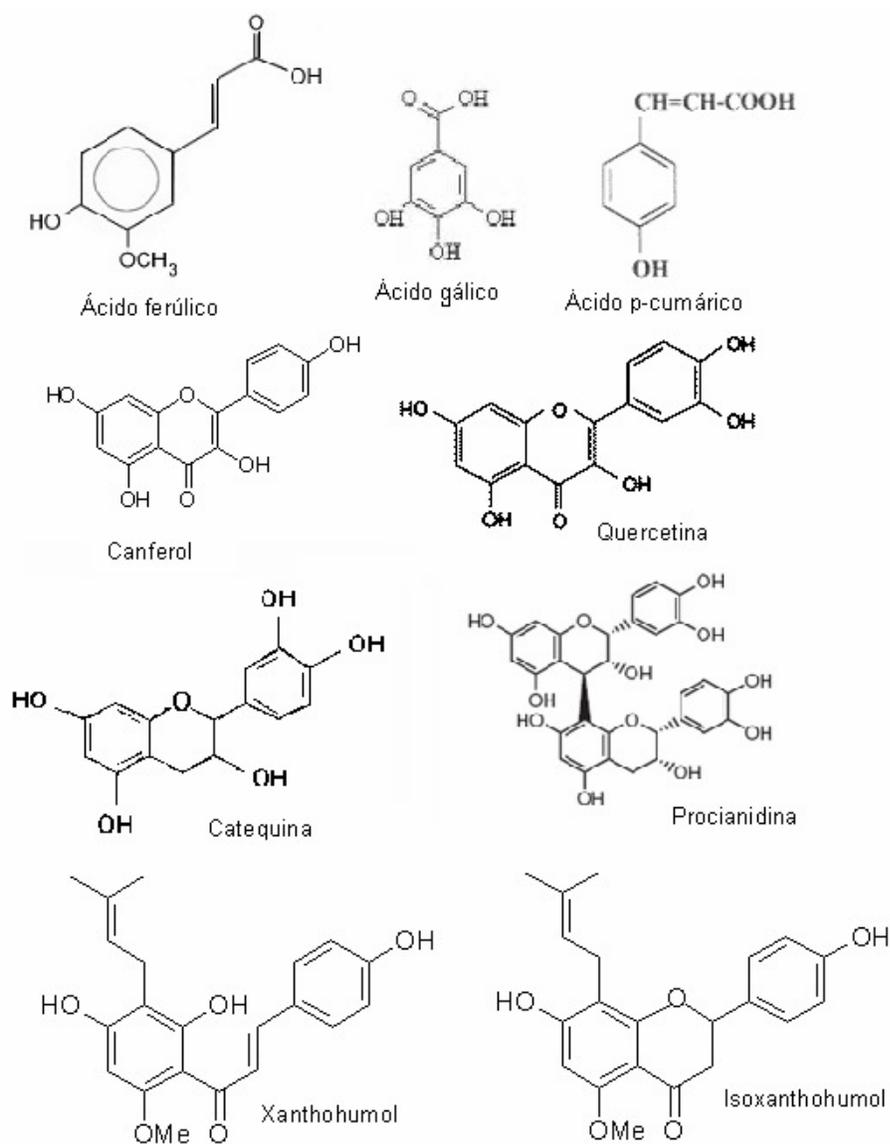
Os compostos fenólicos podem ser encontrados em sua forma livre ou, mais freqüentemente, ligados a outros compostos, como ésteres e glicosídeos. Polifenóis derivados de ácidos hidrobencínicos (ácido gálico, ácido protocatechuico, ácido siríngico) e ácidos hidroxicinâmicos (ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido caféico) são principalmente extraídos do malte, enquanto que os flavonóides (quercetina, canferol), chalconas (xanthohumol) e flavanonas (isoxanthohumol e prenilnaringenina) são encontrados no lúpulo (Figura 2.1). Catequinas, procianidinas e taninos derivados de flavonóides são igualmente encontrados no malte e no lúpulo. A composição final dos compostos fenólicos na

cerveja depende da qualidade da matéria-prima (cevada e lúpulo) utilizada e do processo de fermentação (Garcia *et al.*, 2004).

Fantozzi *et al.* (1998) mostrou que durante todo o processamento da cerveja, há um decréscimo de 28% na concentração de compostos fenólicos, e simultaneamente uma redução de 29% na sua atividade antioxidante.

A Tabela 2.1 mostra os principais compostos fenólicos já encontrados em cerveja e sua concentração aproximada (Gerhäuser, 2005).

Polifenóis de baixo peso molecular são considerados melhores antioxidantes, pois o poder redutor decresce com o aumento do peso molecular. Alguns polifenóis são antioxidantes por sua habilidade em quelar íons metálicos e outros são considerados pro-oxidantes devido à sua capacidade de transferir elétrons para íons metálicos (Vanderhaegen *et al.*, 2006).



**Figura 2.1** Estrutura química de alguns compostos fenólicos encontrados na cerveja.

**Tabela 2.1** Principais compostos fenólicos encontrados na cerveja.

<b>Classe Estrutural</b>	<b>Concentração (mg/l)</b>
Chalconas	
Xanthohumol	0,02 – 1,2
Flavanonas	
Isoxanthohumol	0,04 – 3,44
6-prenil-naringenina	0,001 – 0,56
8-prenil-naringenina	0,001 – 0,24
Flavan-3-ols (catequinas)	
Catequina	5,4
Galocatequina	5 - 20
Epicatequina	1,1
Flavonóis	
Kampeferol	16,4
Quercetina	10
Quercitrina	2,3
Rutina	1,8
Proantocianidinas	
Procianidina B3	3,3
Procianidina B9	3,9
Ácidos	
Alfa-ácidos	1,7
Iso alfa-ácidos	0,6 – 100
Ácido ferúlico	6,5
Ácido p-cumárico	0,9
Ácido benzóico	1,1
Ácido vanílico	3,6
Ácido siríngico	0,5
Outros	
4-hidroxipreniletanol	40
4-vinil guaiacol	0,55

Fonte: Gerhauser (2005).

O composto fenólico mais simples já encontrado na cerveja é o ácido ferúlico. Outros compostos fenólicos monoméricos são a catequina e a quercetina. A catequina é aceita como um composto antioxidante devido à sua capacidade de quelar radicais livres e inibir a enzima lipoxigenase, que promove o início da ruptura dos ácidos graxos insaturados (Bamforth, 2000). Quando moléculas monoméricas de fenóis são liberadas elas podem se polimerizar, formando novos compostos fenólicos.

O ácido ferúlico é o principal ácido fenólico encontrado na cerveja, entre 48 e 58% do total de ácidos fenólicos. Está presente na cevada, sendo que aproximadamente 10% em sua forma livre e o restante ligado na forma de éster com polímeros arabinosilados.

Walters *et al.* (1997) mostrou que o ácido ferúlico tem maior atividade antioxidante que a catequina na presença de radical hidroxila, além de ser mais efetivo na prevenção de oxidação lipídica. No entanto, a catequina apresentou maior atividade seqüestrante de radicais superóxidos.

Xanthohumol é o prenilflavonóide de maior importância encontrado no lúpulo. No entanto, durante o processamento da cerveja, sua quantidade é sensivelmente reduzida devido à isomerização das chalconas. Apesar da menor concentração de prenilflavonóides comparados a outros polifenóis, eles têm uma maior capacidade antioxidante em meios lipofílicos, como lipoproteínas de baixa densidade (Stevens & Page, 2004).

A cevada é também uma rica fonte de polifenóis e, portanto de propriedades antioxidativas. Desta forma, uma otimização do processo de maltagem visando à proteção dos polifenóis presentes na cevada e promoção de novos compostos antioxidantes é uma alternativa viável para minimizar o processo oxidativo da cerveja (Maillard *et al.*, 1996).

Estudos realizados por Maillard *et al.* (1996) mostram o teor de polifenóis totais de três principais grupos de compostos fenólicos em diferentes variedades de cevada e no malte, determinados por uma nova metodologia de

espectrofotometria UV e comparado às concentrações obtidas através da metodologia colorimétrica de Folin-Ciocalteu. Os resultados mostraram que o malte apresenta maiores concentrações de polifenóis que a cevada, porém não foram encontradas diferenças significativas entre os diferentes grupos estudados. Os valores obtidos através da metodologia de espectrofotometria UV apresentou diferenças entre 5 e 15% em relação ao método Folin-Ciocalteu.

Os compostos polifenólicos têm papel extremamente importante no processamento da cerveja. Durante o processamento os polifenóis, principalmente os flavonóis, podem se polimerizar e combinar com proteínas, causando turbidez no produto (Keukeleire, 1999).

Ácidos fenólicos podem se combinar com outras substâncias naturalmente presentes na cerveja, como açúcares, ácidos orgânicos, substâncias nitrogenadas e íons metálicos, dificultando sua quantificação (Montanari *et al.*, 1999).

## 2.5 ENVELHECIMENTO

Comparada à outras bebidas alcoólicas, a cerveja é a única que permanece instável após a embalagem e durante sua vida de prateleira. Tal instabilidade pode ser biológica ou não. A instabilidade biológica envolve a contaminação por microorganismos, como bactérias, fungos e leveduras, provenientes da matéria-prima ou do processamento. No entanto, esta contaminação pode ser evitada utilizando-se condições higiênicas de processamento, além da etapa de pasteurização do produto.

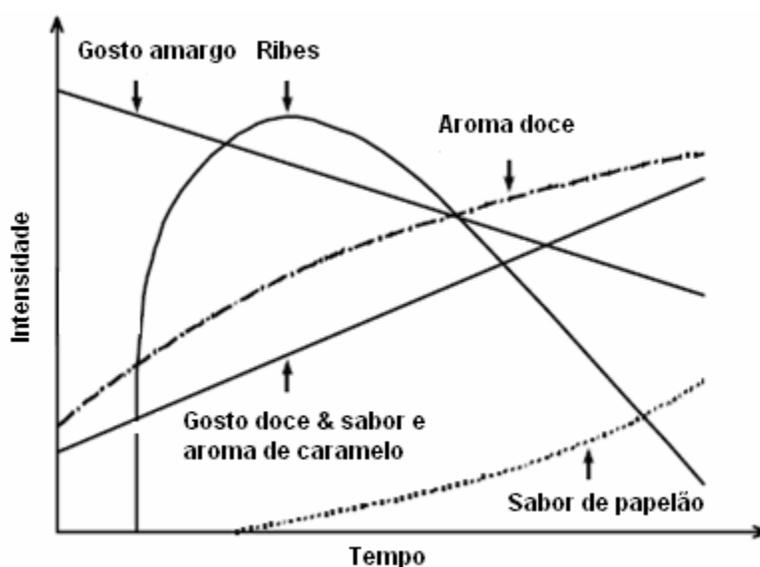
A instabilidade não biológica é proveniente de uma série de reações químicas envolvendo proteínas, carboidratos, polifenóis e íons metálicos que alteram a estrutura física do produto (Stewart, 2004).

A instabilidade física da cerveja ocorre principalmente pela formação de turbidez, a partir da reação de polimerização dos compostos fenólicos e sua associação com algumas proteínas. A matéria-prima utilizada para a produção da cerveja é fonte de precursores da turbidez, como polifenóis e proteínas, mas sua formação pode ser estimulada por uma série de fatores, como a presença de oxigênio e de íons metálicos, pasteurização, e principalmente a temperatura de estocagem, que acelera a taxa das reações. Diversos procedimentos que podem prevenir ou retardar o aparecimento da turbidez: prevenir a formação de grande quantidade de produtos de degradação dos complexos protéicos, fazer uma hidrólise enzimática destes produtos de degradação, remover compostos fenólicos de maior peso molecular, armazenar a cerveja no estágio de maturação em temperaturas bem altas a fim de precipitar os precursores da formação da turbidez ou ainda armazenar o produto final em temperaturas mais elevadas para retardar o aparecimento da turbidez.

O uso de agentes estabilizantes para prevenir a formação de turbidez é muito utilizado na indústria. Estes podem ser sílica gel ou polivinil-polipirrolidona (PVPP). A sílica gel age ligando-se a polipeptídeos hidrofílicos, enquanto o PVPP remove os polifenóis de maior peso molecular, por ter uma estrutura muito semelhante à do aminoácido prolina.

A estabilidade do sabor na cerveja depende principalmente da quantidade de oxigênio presente na embalagem e presença de luz, mas pode ser influenciada por outras etapas do processamento. A natureza das mudanças que ocorrem durante o envelhecimento do produto e a formação de novos sabores e aromas é bastante complexa e depende do tipo de cerveja, da concentração de oxigênio e da temperatura de estocagem. Dalglish (1977) descreveu as mudanças sensoriais na cerveja durante seu armazenamento (Figura 2.2).

Dentre as principais mudanças observadas, ressalta-se um aumento no aroma e gosto doce, diminuição da intensidade do gosto amargo, e a relação entre o aumento do sabor de papelão, e diminuição do sabor denominado *ribes* (*ribes nigrum*), descrito como aroma típico de folhas de *black currant*, fruta silvestre parecida com a groselha.



**Figura 2.2** Alterações sensoriais durante o envelhecimento da cerveja segundo Dalgliesh (1977).

As mudanças do perfil de sabor da cerveja são resultado de reações de degradação e formação de novos compostos. Dentre os compostos formados, os aldeídos de cadeia linear merecem atenção especial. Além destes, podem ser encontrados compostos heterocíclicos, cetonas, ésteres, compostos sulfurados, entre outros.

A Tabela 2.2 apresenta uma lista dos principais compostos que podem ser encontrados na cerveja durante seu armazenamento.

**Tabela 2.2** Principais compostos voláteis responsáveis por alterações no sabor e aroma, formados durante o armazenamento da cerveja.

Classe química	Compostos
Aldeídos lineares	Acetaldeído/ (E)-2-nonenal/ (E)-2-octenal
Aldeídos de Strecker	2-metil-butanal/ metional/ 2-prenilacetaldeído
Cetonas	(E)- $\beta$ -damascenona/ 4-metil-2-pentanona
Compostos heterocíclicos	Furfural/ maltol/ 2-acetilpirazina/
Ésteres etílicos	Etil 3-metil butirato/ etil nicotinato/ etil 2-metil propianato
Compostos sulfurados	Dimetil trissulfido/ 3-metil-3-mercaptoputilformato

O acetaldeído foi um dos primeiros compostos cujo aumento da concentração foi observado em cervejas. Em seguida o *trans*-2-nonenal, um aldeído linear, foi identificado como o composto que induzia o sabor de papelão na cerveja (Jamieson e Van Gheluwe, 1970), quando encontrado em concentrações maiores que seu limiar de detecção de 0,1  $\mu\text{g/l}$ . O composto  $\beta$ -damascenona, uma cetona derivada de carotenóides, pode afetar o sabor de cervejas durante o envelhecimento (Gijs *et al.*, 2002). Dentre os compostos heterocíclicos, alguns podem ser indicadores do processo de envelhecimento de cervejas. Ésteres voláteis contribuem com notas frutais no perfil de sabor da cerveja, entretanto a concentração destes ésteres diminui durante a estocagem e alguns ésteres (Etil 3-metil butirato, etil nicotinato, etil 2-metil propianato) têm sua concentração aumentada, gerando sabor de vinho (winy flavours). Esta característica confere significativa importância a estes compostos.

Os compostos sulfurados mesmo em baixas concentrações podem provocar efeitos notáveis no perfil de sabor da cerveja durante a estocagem. Compostos não voláteis também podem provocar mudanças no sabor da cerveja durante a estocagem. Os ácidos-iso- $\alpha$ , um dos responsáveis pelo gosto amargo,

são muito sensíveis à degradação, provocando uma redução do gosto amargo durante o envelhecimento. Além deles, foi também observado o decréscimo na concentração de flavonóis, principalmente durante as 5 primeiras semanas de estocagem (McMurrough *et al.*, 1996) e aumento na concentração de taninos (McMurrough, Madigan and Kelly, 1997). Mudanças na concentração de compostos fenólicos estão associadas ao aumento da adstringência em cervejas.

O aparecimento do sabor de papelão (cardboard flavour) é o maior indicador do processo de envelhecimento de cervejas, principalmente as do tipo *lager*. Há evidências de que o aparecimento de sabor característico de papelão em cervejas entre 2 e 4 meses é proveniente de aldeídos insaturados. O composto *trans-2-nonenal* é o aldeído com maior atividade de sabor encontrado em quantidades que excedem o limiar de detecção. Outros aldeídos como o nonadienal, decadienal e undecadienal também podem ser encontrados em quantidades superiores ao limiar de detecção (Barker *et al.*, 1983).

O aumento da concentração de *trans-2-nonenal* durante a vida de prateleira da cerveja está provavelmente ligado ao processo de oxidação nos estágios iniciais do processamento. Estudos recentes (Lermusieau *et al.*, 1999; Liegeois *et al.*, 2002) mostraram que 70% do total de *trans-2-nonenal* produzido ocorreu durante a fervura do mosto, enquanto que o restante ocorreu durante a moagem.

O *trans-2-nonenal* é derivado da oxidação do ácido linoleico no final da etapa de fervura. Ao se ligar a compostos nitrogenados, como aminoácidos e proteínas, o *trans-2-nonenal* é protegido da atividade das leveduras, podendo estar presente no produto fresco. Posteriormente, principalmente quando o pH da cerveja é baixo ou a estocagem se dá em temperatura alta, este composto pode ser liberado através de hidrólise ácida (Lermusieau *et al.*, 2001).

O uso de sulfitos durante o processamento limita a formação de aldeídos e minimiza os efeitos da oxidação do produto. No entanto, uma alternativa ao uso de sulfitos ou outros agentes antioxidantes é a otimização do aproveitamento do poder antioxidante de substâncias naturalmente encontradas na cerveja. Segundo

Stone e Laschiver (1957) a maior parte do bissulfito encontrado na cerveja está na sua forma ligada. Alguns autores observaram que a adição de bissulfito em cervejas envelhecidas diminui a concentração de aldeídos livres (Pessa, 1971). No entanto, ao longo do tempo o bissulfito se oxida a sulfato, aumentando a concentração de aldeídos livres (Stewart, 2004). Desta forma, a teoria mais aceita para a formação dos compostos que dão origem ao sabor de papelão na cerveja é devido à formação de complexos a partir do bissulfito. A formação destes complexos é reversível e favorece a formação de aldeídos alifáticos, além da tendência do bissulfito de se ligar à dupla ligação de aldeídos insaturados e aos produtos de condensação de aminoácidos e carbonilas.

## **2.6 ANÁLISE SENSORIAL**

O conhecimento da composição química e perfil sensorial da cerveja durante o processo de envelhecimento, é muito importante para o controle de qualidade e para a avaliação das alterações que possam contribuir para a melhoria do produto.

A análise sensorial é uma ferramenta de grande importância, que permite a correlação entre a composição química e percepção sensorial de um alimento, assim como o grau de aceitação que o consumidor tem por um dado produto.

### **2.6.1 Análise Descritiva quantitativa**

A Análise Descritiva Quantitativa (STONE *et al.*, 1974) apresenta-se como uma metodologia que proporciona a obtenção de uma completa descrição de todas as propriedades sensoriais de um produto, representando um dos métodos

mais completos e sofisticados para a caracterização sensorial de atributos importantes.

A Análise Descritiva Quantitativa permite traçar o perfil sensorial dos produtos avaliados, e quando é associada ao estudo afetivo de consumidor, permite chegar-se a conclusões de extrema importância, como saber quais as características sensoriais e em que intensidade estão presentes, nos produtos mais ou menos aceitos pelos consumidores, e ainda verificar em que produtos concorrentes diferem sensorialmente entre si.

### **2.6.2 Teste afetivo**

Dentre os métodos sensoriais disponíveis para se medir a aceitação e preferência dos consumidores com relação a um ou mais produtos, a escala hedônica estruturada de nove pontos é provavelmente o método afetivo mais utilizado devido à confiabilidade e validade de seus resultados, bem como sua simplicidade em ser utilizada pelos provadores (Stone & Sidel, 1993).

A análise da aceitação pode refletir o grau de preferência por determinado produto. Porém, quando os dados da aceitação são analisados por técnicas estatísticas univariadas, assume-se que o critério de aceitabilidade dos consumidores seja homogêneo, o que implica que os valores obtidos desta forma podem não refletir a média real. Por esta razão a variabilidade individual dos dados deve também ser considerada, e a estrutura dos dados analisada. Com a finalidade de analisar os dados afetivos levando-se em consideração a resposta individual de cada consumidor e não somente a média do grupo de consumidores que testaram os produtos, foi desenvolvida a técnica intitulada Mapa de Preferência. O Mapa de Preferência é essencialmente uma representação gráfica (Multidimensional Scaling - MDS) das diferenças de aceitação entre as amostras, que permite a identificação de cada indivíduo e suas preferências em relação às amostras analisadas. O Mapa de Preferência pode ser dividido em duas

categorias: o Mapa de Preferência Interno (MDPREF), quando se realiza a análise apenas sobre o conjunto de dados de aceitação/preferência gerados a partir de testes afetivos, e o Mapa de Preferência Externo (PREFMAP), onde se incluem também na análise as medidas descritivas geradas por uma equipe de provadores treinados, relacionando-as com dados de aceitação/preferência dos produtos avaliados (MacFie & Thomson, 1998).

O MDPREF baseia-se num modelo vetorial e resolve uma matriz com os dados de aceitação de uma equipe de provadores sobre um mesmo conjunto de amostras. O resultado obtido consiste em um conjunto de dimensões de preferência representando as diferenças entre as amostras em termos de aceitação entre os consumidores e um conjunto de vetores, um para cada provador, que mostram a direção individual de preferência.



## **CAPÍTULO 3. ESTABILIDADE OXIDATIVA: ENVELHECIMENTO FORÇADO**

### **3.1 MATERIAIS**

#### **3.1.1 Amostras**

Três tipos diferentes de cerveja *pilsen* foram avaliados periodicamente durante sua vida de prateleira. Dentre as diferentes cervejas, duas são da mesma marca (A e B), porém produzidas em fábricas diferentes. Em uma delas o processo de estabilização é feito com uso de PVPP (polivinilpolipirrolidona), que retém parte dos compostos fenólicos, responsáveis pelo problema da turbidez no produto. Na outra, a estabilização é feita com sílica, que retém parte das proteínas, que ao se complexarem com os compostos fenólicos causam turbidez

no produto. No terceiro tipo de cerveja analisado (amostra C) o processo de estabilização também é feito com uso de PVPP, porém a bebida é produzida com lúpulo e linhagem de levedura diferentes das demais (A e B), sendo que a relação malte/adjunto bem como a relação lúpulo aromático/lúpulo de amargor é maior que nas demais cervejas.

As cervejas foram fornecidas pelas fábricas logo após o envase, duas marcas em embalagens de alumínio, e uma em garrafas de vidro (long neck). Os lotes foram rigorosamente escolhidos, encontrando-se dentro das especificações características de cada produto. A Tabela 3.1 mostra as características físico-químicas, fornecidas pelos fabricantes, de cada amostra. Todas as amostras foram estocadas a temperatura ambiente e em local protegido contra a luz.

**Tabela 3.1** Características físico químicas das amostras de cerveja A, B e C.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Álcool (% v/v)</b>	3,66	3,75	4,05
<b>Densidade 20/4</b>	1,00813	1,00728	1,00656
<b>Calorias (Kcal/100mL)</b>	40,77	40,73	42,71
<b>Cor (EBC)</b>	5,15	4,68	7,06
<b>pH</b>	4,05	4,19	4,20
<b>Amargor (BU)</b>	9,0	10,0	17,0
<b>CO<sub>2</sub></b>	0,51	0,49	0,49
<b>Dicetonas Totais</b>	0,04	0,05	0,03
<b>Turbidez 20°C</b>	0,52	0,75	0,49
<b>Espuma (Nibem)</b>	206	192	258

### 3.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nos testes bioquímicos foram os padrões Trolox® (AcrosOrganics), ácido ascórbico e ácido gálico (Sigma-Aldrich), o radical livre DPPH – 2,2 difenil-1-picrilhidrazila (Sigma-Aldrich) e o composto ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato - Sigma-Aldrich). Os demais reagentes usados foram persulfato de potássio (Sigma-Aldrich), DDTC - dietiltiocarbamato de sódio cristalino (Sigma-Aldrich), ferrocianeto de potássio (Sigma-Aldrich), álcool etílico e álcool metílico (ECIBRA), hidróxido de amônio 28-30% (ECIBRA), carbonato de sódio anidro (ECIBRA), ácido tricloroacético (Merck), sulfato de cobre II (Merck), cloreto férrico (Labsynth) e reagente Folin-Ciocalteu (Cromoline).

### 3.1.3 Equipamentos

Para obtenção das medidas colorimétricas foi utilizado o espectrofotômetro Beckman Coulter DU 640.

As amostras foram degaseificadas em ultrassom UltraSonic Cleaner Thornton – Unique, e centrifugadas em centrífuga Beckman Coulter modelo Allegra X-22R. A estufa utilizada foi Estufa Fanem, modelo 002CB.

### 3.1.4 Estratégia

As amostras de cerveja, com idade de 30 dias, foram colocadas em estufa a 42°C durante 6 dias. Em cada um dos seis dias de estocagem as cervejas foram submetidas a testes bioquímicos para determinação da concentração de fenóis totais e capacidade antioxidante.

### **3.1.5 Preparação das amostras**

Para cada dia de teste foram utilizadas duas embalagens de cada tipo de cerveja. Cada tipo, separadamente, foi misturado, submetido a 3 minutos de ultrassom para degaseificação, e filtrado.

## **3.2 METODOLOGIA**

### **3.2.1 Compostos Fenólicos Totais**

Os compostos fenólicos totais foram determinados colorimetricamente através do reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965). Uma alíquota de 2 mL de cerveja diluída em água destilada foi adicionada a 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 9 mL de água destilada. Após 3 minutos adicionou-se 8 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após repouso durante 2h a temperatura ambiente, a absorbância foi lida através de uma curva padrão a 760 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico.

### **3.2.2 Capacidade de seqüestrar radicais livres**

A capacidade seqüestrante de radicais livres foi medida usando-se o reagente DPPH (1,1-difenyl-2-picrilhidrazila) a partir da adaptação da metodologia descrita por Blois (1958) e Molyneux (2004).

O DPPH é um radical livre estável, no qual o deslocamento de um elétron livre confere cor violeta à solução com absorção a 517 nm.

Quando uma solução de DPPH é misturada a uma substância capaz de doar um átomo de hidrogênio, ela reage dando origem à forma reduzida do DPPH, e ocorre a extinção da cor violeta. Esta reação dá origem a um novo radical livre.

Diferentes concentrações da amostra diluída em metanol foram adicionadas a 2 ml de solução de DPPH (250  $\mu$ mol), completando um volume final de 5 ml. A mistura foi agitada e deixada em repouso no escuro e a temperatura ambiente por 2 horas. A taxa de reação varia muito entre diferentes substratos, e é mais um parâmetro para caracterizar a atividade antioxidante. A leitura da absorbância foi realizada a 517 nm.

A capacidade da cerveja doar hidrogênio foi calculada através da extinção da cor do DPPH, expressa em porcentagem do controle (água destilada no lugar da amostra). Quanto maior a porcentagem de redução do DPPH (Equação 3.1) maior a atividade antioxidante da amostra.

$$Q = 100 \frac{(A_0 - A_c)}{A_0} \quad (\text{Equação 3.1})$$

$A_0$  = absorbância do controle

$A_c$  = absorbância da amostra

Uma outra forma utilizada para interpretar os dados é a  $EC_{50}$  (Efficient concentration), definida como a quantidade de substrato capaz de diminuir a concentração inicial de DPPH a 50% de seu valor. Quanto maior o valor de  $EC_{50}$  maior a quantidade de substrato que deve ser utilizado para reduzir o radical DPPH, e conseqüentemente sua capacidade antioxidante será menor.

### 3.2.3 Poder redutor

O poder redutor da cerveja foi determinado a partir da metodologia utilizada por Lugasi (2003). Amostra diluída (1 ml) foi adicionada a 2,5 ml de tampão fosfato (0,2M, pH 6,6) e 2,5 ml de ferrocianeto de potássio 1%. Esta mistura foi incubada

a 50°C por 20 minutos, e em seguida adicionou-se 2,5 ml de ácido tricloroacético 10%. Uma alíquota de 2,5 ml desta solução foi adicionada a 2,5 ml de água destilada e 0,5 ml de solução FeCl<sub>3</sub> 0,1%.

A absorbância foi lida em comprimento de onda de 700 nm, e o poder redutor expresso em equivalente de ácido ascórbico (ASE ml<sup>-1</sup>). ASE ml<sup>-1</sup> indica que 1 ml da amostra apresenta o mesmo poder redutor que a mesma quantidade de ácido ascórbico.

### 3.2.4 Capacidade antioxidante total

Este teste mede a habilidade de um composto antioxidante seqüestrar o cátion ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis(3-ethylbenzotiazolina-6-sulfonato) em comparação ao composto padrão Trolox®. A metodologia utilizada foi proposta por Re *et al.* (1999).

A metodologia ABTS<sup>•+</sup> original foi baseada na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio, na presença ou ausência de antioxidantes, para produzir um radical cátion. Hoje, a metodologia envolve a produção direta do cromóforo ABTS<sup>•+</sup>, com tonalidade azul esverdeada através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. Esta técnica espectrofotométrica mede a habilidade relativa de antioxidantes de seqüestrar o ABTS<sup>•+</sup> em comparação ao potencial antioxidante de quantidades padrão de Trolox®. Trolox® é um análogo da vitamina E, solúvel em água, e o cátion ABTS<sup>•+</sup> é um cromóforo azul esverdeado com características de absorção a 734 nm, que quando é reduzido a ABTS, perde sua coloração. Os resultados são expressos em mmol de Trolox/l de amostra.

Em resumo, o monocátion ABTS<sup>•+</sup> é gerado a partir da oxidação do ABTS com persulfato de potássio e reduzido na presença de compostos antioxidantes capazes de doar hidrogênio. Esta metodologia mede a atividade antioxidante, determinada pela descolorização do ABTS<sup>•+</sup> medida através da redução do radical cátion expressa em porcentagem de inibição da absorbância a 734 nm. A taxa de

descolorização é função da concentração e tempo, e relaciona-se à reatividade do Trolox®, sob as mesmas condições.

Para o preparo da solução de ABTS<sup>+</sup> fez-se a dissolução do ABTS em água na concentração de 7 mM, e misturou-se com persulfato de potássio 2,45 mM. A mistura foi deixada no escuro por 12 a 16h. Diluiu-se a solução com etanol até atingir a absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm, e a amostra foi diluída de forma que ao colocar 10 µl dela na solução fosse possível obter 20 a 80% da absorbância em relação ao branco.

A curva padrão foi feita com 1,0 ml do ABTS<sup>+</sup> diluído em 10 µl de Trolox® até concentração de 15 µM.

### 3.2.5 Atividade Redutora do Cobre

A atividade antioxidante de compostos fenólicos pode ser determinada através de sua atividade redutora sobre Cu<sup>2+</sup>. A metodologia utilizada foi baseada no método CRAI (índice da atividade redutora do cobre), proposto por Rufián-Henares (2006).

Este teste mede a redução de Cu<sup>2+</sup> e formação de Cu<sup>+</sup> na presença de antioxidantes. Inicialmente prepara-se uma solução contendo 100 µl de solução aquosa CuSO<sub>4</sub> (20 mM) e 5 ml da amostra previamente dissolvida em água (1:10). Após 10 minutos adiciona-se 250 µl de DDTC 1% e 250 µl de solução NH<sub>3</sub> 30%. Agitar a mistura no vórtex por 5 segundos para formar Cu<sup>2+</sup>-DDTC, que é um complexo insolúvel, e centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos (10000 rpm). A quantificação do Cu<sup>+</sup> foi feita através da medida da absorbância no sobrenadante a 450 nm. Para construir a curva padrão foi utilizado Trolox®, até concentração de 1,15 mM.

### 3.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

Todos os testes foram realizados em duplicata e avaliados estatisticamente, utilizando-se o software Statistica versão 5.5. Para cada resultado expressou-se a média, desvio padrão e comparação entre as médias determinada através de Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

### 3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.4.1 Compostos Fenólicos Totais

A concentração de compostos fenólicos totais não se alterou durante o período de envelhecimento (Tabela 3.2; Figura 3.1). A amostra C apresentou concentração de fenóis significativamente maior que as demais amostras em todos os dias de envelhecimento, com exceção do primeiro dia (Tabela 3.3)

**Tabela 3.2** Concentração total de fenóis durante envelhecimento forçado das amostras A, B e C.

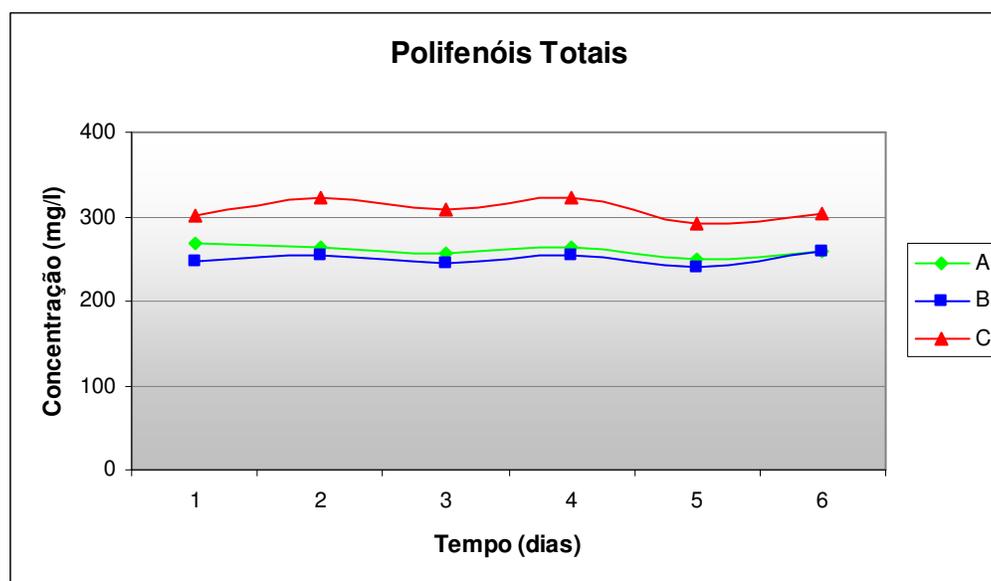
Dia	Amostra		
	A	B	C
1	268 ± 9 a	246 ± 5 a	301 ± 6 ab
2	264 ± 1 a	254 ± 1 a	322 ± 4 a
3	256 ± 1 a	245 ± 2 a	308 ± 1 ab
4	264 ± 1 a	254 ± 1 a	322 ± 4 a
5	248 ± 7 a	240 ± 6 a	292 ± 6 b
6	259 ± 1 a	258 ± 1 a	304 ± 8 ab

Concentração de fenóis totais é expressa em mg de ácido gálico / l de amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 3.3** Concentração total de fenóis durante envelhecimento forçado: comparação entre as amostras A, B e C.

Amostra	Dia					
	1	2	3	4	5	6
A	268 ± 9 ab	264 ± 1 a	256 ± 1 a	264 ± 1 a	248 ± 7 a	259 ± 1 a
B	246 ± 5 a	254 ± 1 a	245 ± 2 b	254 ± 1 a	240 ± 6 a	258 ± 1 a
C	301 ± 6 b	322 ± 4 b	308 ± 1 c	322 ± 4 b	292 ± 6 b	304 ± 8 b

Concentração de fenóis totais é expressa em mg de ácido gálico / l de amostra  
Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3.1** Perfil da concentração de compostos fenólicos das amostras A, B e C durante o envelhecimento forçado.

A matéria-prima utilizada na produção da amostra C deve ser o principal motivo da diferença observada entre o teor de fenóis totais desta amostra comparada às demais (A e B).

As amostras A e B são produzidas a partir da mesma matéria-prima e possuem algumas diferenças de processo, principalmente na estabilização da bebida. Como não há diferenças significativas entre elas, podemos concluir que as diferenças no processo não influenciaram na determinação da concentração de

compostos fenólicos, no entanto, a amostra C produzida com matéria-prima diferente apresentou um aumento na concentração de fenóis totais.

A concentração de compostos fenólicos totais foi avaliada em diferentes variedades de lúpulo e observaram-se diferenças entre as amostras de até 250% no teor de fenóis totais (Lermusieau *et al.*, 2001) Portanto, o emprego de diferentes variedades de lúpulo e cevada na produção de cervejas pode apresentar diferenças na concentração de fenóis totais no produto final, como foi observado também deste trabalho.

### 3.4.2 Capacidade de seqüestrar radicais livres

A capacidade de seqüestrar radicais livres, medida através da redução do radical livre DPPH não apresentou diferenças significativas durante o período de envelhecimento (Tabela 3.4; Figura 3.2). As amostras também não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 3.5).

**Tabela 3.4** Capacidade de seqüestrar radicais livres durante envelhecimento forçado das amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
1	276 ± 8 a	267 ± 7 a	273 ± 8 a
2	279 ± 12 a	278 ± 12 a	221 ± 9 b
3	238 ± 7 b	265 ± 7 a	243 ± 7 ab
4	273 ± 11 ab	269 ± 11 a	228 ± 10 b
5	240 ± 7 b	250 ± 7 ab	244 ± 7 ab
6	258 ± 7 ab	216 ± 6 b	226 ± 6 b

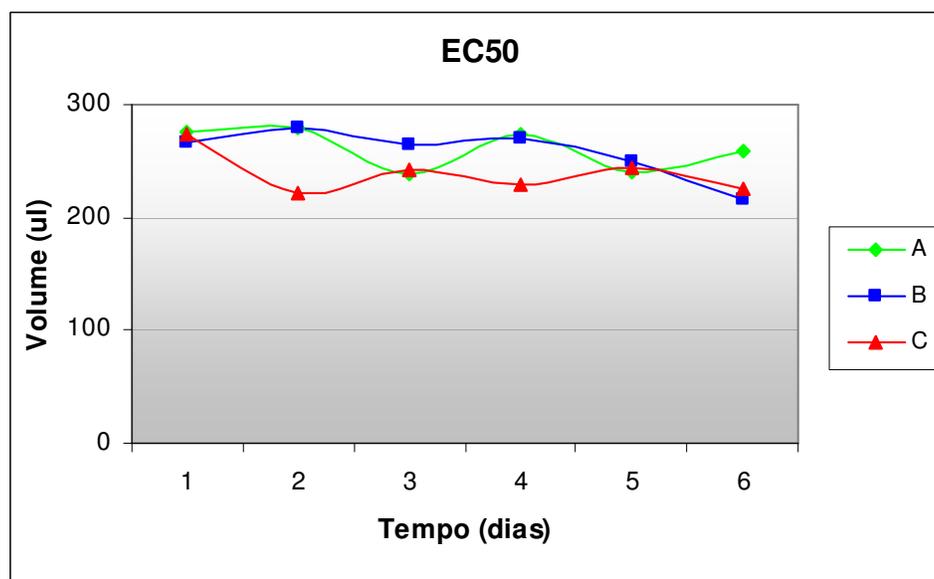
EC50 é expresso em µl de amostra necessária para reduzir 50% do DPPH. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 3.5** Capacidade de seqüestrar radicais livres durante envelhecimento forçado: comparação entre as amostras A, B e C.

Amostra	Dia					
	1	2	3	4	5	6
A	277 ± 7 a	287 ± 1 a	257 ± 9 a	280 ± 2 a	250 ± 7 a	242 ± 9 a
B	275 ± 5 a	249 ± 3 a	240 ± 10 a	250 ± 11 a	242 ± 9 a	242 ± 10 a
C	265 ± 4 a	243 ± 4 a	249 ± 5 a	242 ± 8 a	242 ± 4 a	217 ± 7 a

EC50 é expresso em µl de amostra necessária para reduzir 50% do DPPH

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3.2** Perfil dos valores de EC50 das amostras A, B e C durante o envelhecimento forçado.

### 3.4.3 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total apresentou alterações significativas apenas para a amostra C, ao comparar o primeiro e último dia de envelhecimento. (Tabela 3.6; Figura 3.3).

A amostra C apresentou capacidade antioxidante superior às demais amostras no 1º, 4º e 5º dias de análise (Tabela 3.7).

**Tabela 3.6** Capacidade antioxidante total durante envelhecimento forçado das amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
1	713±11 a	683±22 ac	777±11 a
2	667±11 a	622±9 b	713±17 ab
3	648±13 a	599±7 b	693±15 b
4	666±6 a	708±4 c	778±18 a
5	638±17 a	681±17 ac	748±11 ab
6	683±13 a	703±13 c	693±27 b

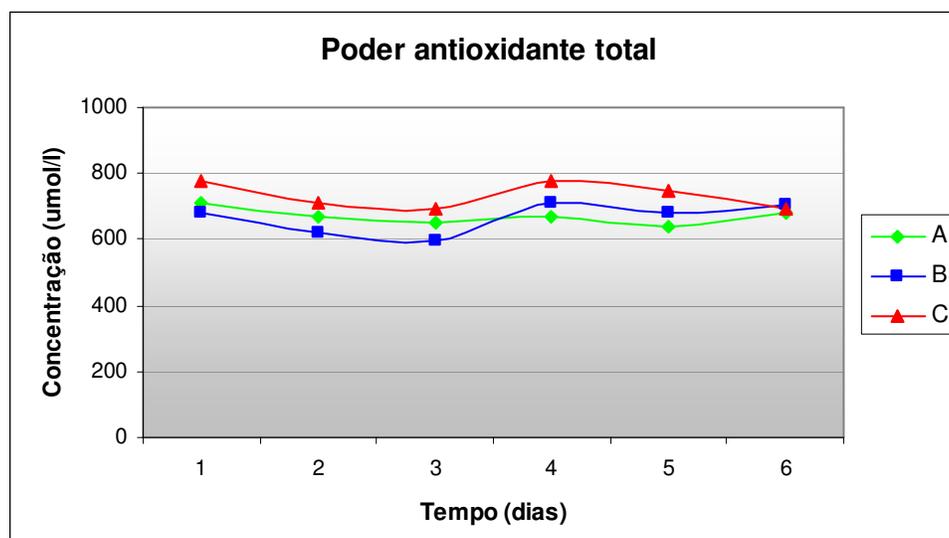
Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 3.7** Capacidade antioxidante total durante envelhecimento forçado: comparação entre as mostras A, B e C.

Amostra	Dia					
	1	2	3	4	5	6
A	713±11 a	667±11 ab	648±13 a	666±6 a	638±17 a	683±13 a
B	683±22 a	622±9 b	599±7 a	708±4 a	681±17 a	703±13 a
C	809±11 b	713±17 b	693±15 a	778±18 b	748±11 b	693±27 a

Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Figura 3.3** Perfil da concentração de  $\text{ABTS}^+$  das amostras A, B e C durante o envelhecimento forçado

A maior capacidade antioxidante observada na amostra C pode ser explicada pela diferença na matéria-prima utilizada, com diferentes variedades de lúpulo, além da maior proporção malte/adjunto. A amostra C foi a que apresentou maior concentração de fenóis totais, sugerindo que a matéria-prima pode influenciar tanto na concentração total de compostos fenólicos quanto na sua capacidade antioxidante, e que os compostos fenólicos são importantes atores da estabilidade oxidativa desta bebida.

De fato, existe uma correlação linear entre a concentração de fenóis totais e a atividade antioxidante ( $y = 1,7273x + 255,09$ ;  $R^2 = 0,9918$ ), analisada no primeiro dia de análise, no entanto este comportamento não é observado novamente ao longo do envelhecimento, provavelmente porque ocorre a mudança dos agentes antioxidantes durante o processo, o que poderá ser observado no capítulo 4.

#### 3.4.4 Poder redutor

O poder redutor não apresentou alterações entre os primeiros e o último dia de envelhecimento (Tabela 3.8; Figura 3.4). A amostra C apresentou concentrações equivalentes superiores às demais amostras (Tabela 3.9).

**Tabela 3.8** Poder redutor durante envelhecimento forçado das amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
1	0,702 ± 0,003 a	0,61 ± 0,01 a	0,73 ± 0,01 a
2	0,648 ± 0,004 b	0,59 ± 0,01 ab	0,74 ± 0,01 ab
3	0,693 ± 0,003 ac	0,66 ± 0,01 bc	0,80 ± 0,01 bc
4	0,675 ± 0,005 c	0,69 ± 0,01 c	0,82 ± 0,02 c
5	0,632 ± 0,004 b	0,59 ± 0,01 a	0,70 ± 0,02 a
6	0,648 ± 0,001 b	0,61 ± 0,01 a	0,73 ± 0,01 a

Resultados expressos em equivalente de ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/ml}$ ).

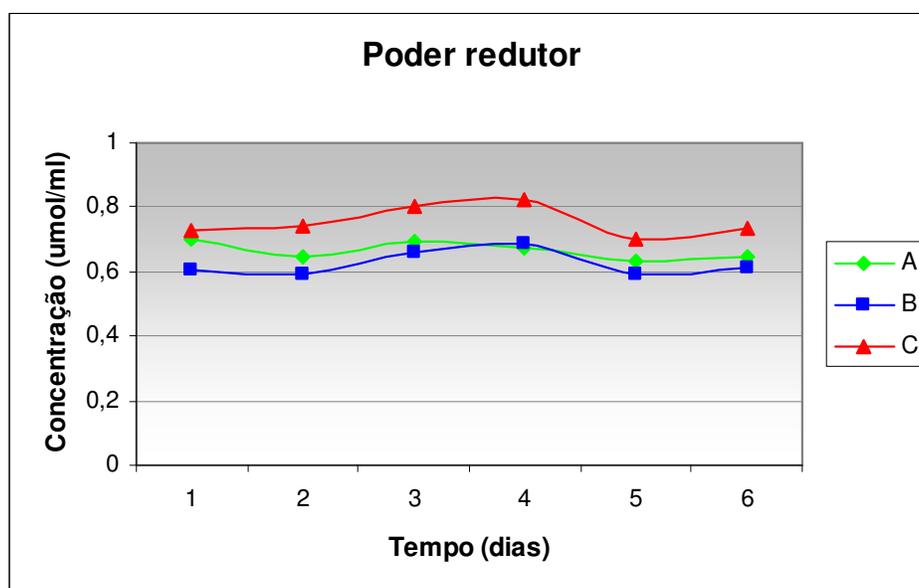
Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0,05$ ).

**Tabela 3.9** Poder redutor durante envelhecimento forçado: comparação entre as amostras A, B e C.

Amostra	Dia					
	1	2	3	4	5	6
A	0,702±0,003 a	0,648±0,004 a	0,693±0,003 a	0,67±0,01 a	0,63±0,01 ab	0,648±0,001 a
B	0,606±0,007 b	0,592±0,009 b	0,661±0,002 b	0,69±0,01 a	0,59±0,01 a	0,612±0,001 b
C	0,729±0,008 c	0,742±0,001 a	0,802±0,007 c	0,82±0,02 b	0,70±0,02 b	0,735±0,006 c

Resultados expressos em equivalente de ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/ml}$ ).

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3.4** Perfil do poder redutor das amostras A, B e C durante envelhecimento forçado.

Os resultados da análise do poder redutor confirmam sua correlação com a concentração de compostos fenólicos ( $y = 0,0021x + 0,1165$ ;  $R^2 = 0,8384$ ) no primeiro dia de análise, e esta tendência permanece durante todo o período de envelhecimento.

### 3.4.5 Atividade Redutora do Cobre

As amostras A e B apresentaram uma redução significativa entre o primeiro e o último dia de envelhecimento (Tabela 3.10; Figura 3.5). A amostra B apresentou concentração de  $\text{Cu}^+$  inferior às demais amostras nos quatro primeiros dias de envelhecimento (Tabela 3.11).

**Tabela 3.10** CRAI (Índice de atividade redutora do cobre) durante envelhecimento forçado das amostras A, B e C.

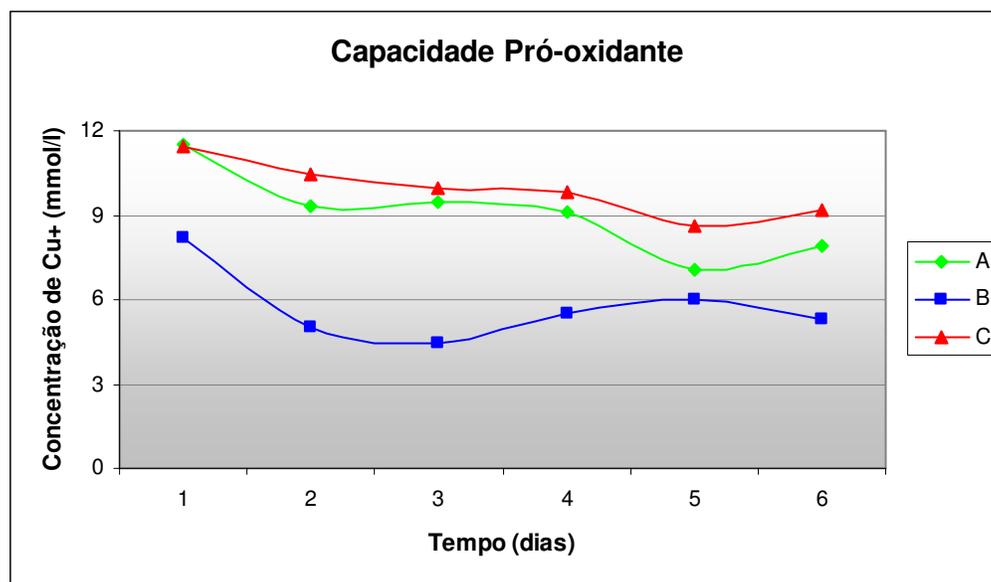
Dia	Amostra		
	A	B	C
1	11,5±0,4 a	8,2±0,6 a	11±1 a
2	9,3±0,4 b	5,0±0,5 b	10±1 a
3	9,5±0,8 b	4,5±0,4 b	10±1 a
4	9,1±0,2 b	5,5±0,3 b	9,8±0,6 a
5	7,0±0,4 c	6,0±0,5 b	8,6±0,7 a
6	7,9±0,2 bc	5,3±0,6 b	9,2±0,5 a

Resultados expressos em mmol de Trolox / ml de amostra  
Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 3.11** CRAI (Índice de atividade redutora do cobre) durante envelhecimento forçado: comparação entre as amostras A, B e C.

Amostra	Dia					
	1	2	3	4	5	6
A	11,5±0,4 a	9,3±0,4 a	9,5±0,8 a	9,1±0,2 a	7±0,4 ab	7,9±0,2 a
B	8,2±0,6 b	5,0±0,5 b	4,5±0,4 b	5,5±0,3 b	6,0±0,5 a	5,3±0,6 b
C	11,4±1 a	10±1 a	10±1 a	9,8±0,6 a	8,6±0,7 b	9,2±0,5 a

Resultados expressos em mmol de Trolox / ml de amostra  
Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 3.5** Perfil da atividade redutora do cobre das amostras A, B e C durante envelhecimento forçado.

A redução de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  na presença de compostos fenólicos representa a capacidade pró-oxidante destes compostos, devido à maior propriedade oxidante do  $\text{Cu}^+$  em relação ao  $\text{Cu}^{2+}$ . O íon  $\text{Cu}^{2+}$  pode ser reduzido na presença de compostos fenólicos ou outros compostos redutores presentes na cerveja, como vitaminas e açúcares redutores. Pode haver também a complexação do íon cobre com compostos como proteínas, aminoácidos e melanoidinas (Oñate-jaén *et al.*, 2006).

A menor concentração de  $\text{Cu}^+$  observada na amostra B pode ser explicada pela diferença de processo desta amostra em relação às demais, que resultou em uma maior taxa de complexação do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , naturalmente presente nos alimentos, ou menor capacidade deste íon se reduzir. No entanto, essa diferença na concentração de  $\text{Cu}^+$  também pode ser devido a uma menor concentração inicial de íons cobre, ou alguma alteração nos primeiros dias de envelhecimento, já que a análise teve início aos 30 dias de estocagem do produto.

### 3.5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

As análises realizadas durante o período de envelhecimento forçado indicam que não houve alteração na concentração de compostos fenólicos totais, e a capacidade antioxidante permaneceu praticamente constante durante todo o período.

A amostra C apresentou maiores concentrações de compostos fenólicos e capacidade antioxidante em relação às demais amostras, provavelmente devido às características da matéria-prima utilizadas em seu processo produtivo.

Os valores encontrados para a concentração de compostos fenólicos para os 3 tipos de cerveja foram entre 250 e 300 mg/l, comparáveis aos teores encontrados por Lugasi (2003) para cervejas européias do tipo lager (270 a 470 mg/l) e menores que os teores encontrados para cervejas escuras (380 a 600 mg/l). O teor de fenóis totais em cervejas é similar ou um pouco maior que o encontrado em vinho branco (100 a 330 mg/l) e menor que o encontrado em vinho tinto (690 a 2500 mg/l) (Beer *et al.*, 2004).

A capacidade antioxidante das amostras de cervejas analisadas encontrou-se dentro da faixa de valores obtidos por Freitas (2006) em cervejas brasileiras (580 a 2800  $\mu\text{mol/l}$ ), e foram ligeiramente inferiores aos obtidos por Pellegrini *et al.* (2003), que obteve 1000  $\mu\text{mol/l}$  para uma amostra de cerveja tipo *lager*. A capacidade antioxidante das amostras de cerveja foram inferiores aos valores obtidos para vinho branco (2700  $\mu\text{mol/l}$ ) (Lugasi, 2003).

A temperatura e tempo (42°C / 6 dias) determinados para este envelhecimento forçado não foram suficientes para provocar alterações no perfil oxidativo do ponto de vista bioquímico.



## **CAPÍTULO 4. ESTABILIDADE OXIDATIVA: ENVELHECIMENTO NATURAL**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Amostras**

Três tipos diferentes de cerveja *pilsen* foram avaliados periodicamente durante sua vida de prateleira. Dentre as diferentes cervejas, duas são da mesma marca (A e B), porém produzidas em fábricas diferentes. Em uma delas o processo de estabilização é feito com uso de PVPP (polivinilpolipirrolidona), que retém parte dos compostos fenólicos, responsáveis pelo problema da turbidez no produto. Na outra, a estabilização é feita com sílica, que retém parte das proteínas, que ao se complexarem com os compostos fenólicos causam turbidez

no produto. No terceiro tipo de cerveja analisado (amostra C) o processo de estabilização também é feito com uso de PVPP, porém a bebida é produzida com lúpulo e linhagem de levedura diferentes das demais (A e B), sendo que a relação malte/adjunto bem como a relação lúpulo aromático/lúpulo de amargor é maior que nas demais cervejas.

As cervejas foram fornecidas pelas fábricas logo após o envase, duas marcas em embalagens de alumínio, e uma em garrafas de vidro (long neck). Os lotes foram rigorosamente escolhidos, encontrando-se dentro das especificações características de cada produto. A Tabela 4.1 mostra as características físico-químicas, fornecidas pelos fabricantes, de cada amostra. Todas as amostras foram estocadas a temperatura ambiente e em local protegido contra a luz.

**Tabela 4.1** Características físico químicas das amostras de cerveja A, B e C

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Álcool (% v/v)</b>	3,66	3,75	4,05
<b>Densidade 20/4</b>	1,00813	1,00728	1,00656
<b>Calorias (Kcal/100mL)</b>	40,77	40,73	42,71
<b>Cor (EBC)</b>	5,15	4,68	7,06
<b>pH</b>	4,05	4,19	4,20
<b>Amargor (BU)</b>	9,0	10,0	17,0
<b>CO<sub>2</sub></b>	0,51	0,49	0,49
<b>Dicetonas Totais</b>	0,04	0,05	0,03
<b>Turbidez 20°C</b>	0,52	0,75	0,49
<b>Espuma (Nibem)</b>	206	192	258

### 4.1.2 Reagentes

Os reagentes utilizados nos testes bioquímicos foram os padrões Trolox (AcrosOrganics), ácido ascórbico e ácido gálico (Sigma-Aldrich), o radical livre DPPH – 2,2 difenyl-1-picrilhidrazila (Sigma-Aldrich) e o composto ABTS – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato - Sigma-Aldrich). Os demais reagentes usados foram persulfato de potássio (Sigma-Aldrich), DDTTC - dietiltiocarbamato de sódio cristalino (Sigma-Aldrich), ferrocianeto de potássio (Sigma-Aldrich), álcool etílico e álcool metílico (ECIBRA), hidróxido de amônio 28-30% (ECIBRA), carbonato de sódio anidro (ECIBRA), ácido tricloroacético (Merck), sulfato de cobre II (Merck), cloreto férrico (Labsynth) e reagente Folin-Ciocalteau (Cromoline).

### 4.1.3 Equipamentos

Para obtenção das medidas colorimétricas foi utilizado o espectrofotômetro Beckman Coulter DU 640.

As amostras foram degaseificadas em ultrassom UltraSonic Cleaner Thornton – Unique, e centrifugadas em centrífuga Beckman Coulter modelo Allegra X-22R.

### 4.1.4 Estratégia

As amostras de cerveja foram submetidas a análises de determinação da concentração de compostos fenólicos e capacidade antioxidante durante 4 meses. Ao todo foram realizadas 13 sessões de testes, dispostas periodicamente ao longo do tempo total de análise.

#### **4.1.5 Preparação das amostras**

Para cada sessão foram utilizadas duas embalagens de cada tipo de cerveja. Cada tipo, separadamente, foi misturado, submetido a 3 minutos de ultrassom para degaseificação, e filtrado.

### **4.2 METODOLOGIA**

#### **4.2.1 Compostos Fenólicos Totais**

Os compostos fenólicos totais foram determinados colorimetricamente através do reagente de Folin-Ciocalteu, segundo metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965). Uma alíquota de 2 mL de cerveja diluída em água destilada foi adicionada a 1 mL de reagente Folin-Ciocalteu e 9 mL de água destilada. Após 3 minutos adicionou-se 8 mL de solução de carbonato de sódio (7,5%). Após repouso durante 2h a temperatura ambiente, a absorbância foi lida através de uma curva padrão a 760 nm. Os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico.

#### **4.2.2 Capacidade de seqüestrar radicais livres**

A capacidade seqüestrante de radicais livres foi medida usando-se o reagente DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) a partir da adaptação da metodologia descrita por Blois (1958) e Molyneux (2004).

O DPPH é um radical livre estável, no qual o deslocamento de um elétron livre confere cor violeta à solução com absorção a 517 nm.

Quando uma solução de DPPH é misturada a uma substância capaz de doar um átomo de hidrogênio, ela reage dando origem à forma reduzida do DPPH, e ocorre a extinção da cor violeta. Esta reação dá origem a um novo radical livre.

Diferentes concentrações da amostra diluída em metanol foram adicionadas a 2 ml de solução de DPPH (250  $\mu\text{mol}$ ), completando um volume final de 5 ml. A mistura foi agitada e deixada em repouso no escuro e a temperatura ambiente por 2 horas. A taxa de reação varia muito entre diferentes substratos, e é mais um parâmetro para caracterizar a atividade antioxidante. A leitura da absorbância foi realizada a 517 nm.

A capacidade da cerveja doar hidrogênio foi calculada através da extinção da cor do DPPH, expressa em porcentagem do controle (água destilada no lugar da amostra). Quanto maior a porcentagem de redução do DPPH (Equação 4.1) maior a atividade antioxidante da amostra.

$$Q = 100 \frac{(A_0 - A_c)}{A_0} \quad (\text{Equação 4.1})$$

$A_0$  = absorbância do controle

$A_c$  = absorbância da amostra

Uma outra forma utilizada para interpretar os dados é a  $EC_{50}$  (Efficient concentration), definida como a quantidade de substrato capaz de diminuir a concentração inicial de DPPH a 50% de seu valor. Quanto maior o valor de  $EC_{50}$  maior a quantidade de substrato que deve ser utilizado para reduzir o radical DPPH, e conseqüentemente sua capacidade antioxidante será menor.

### 4.2.3 Poder redutor

O poder redutor da cerveja foi determinado a partir da metodologia utilizada por Lugasi (2003). Amostra diluída (1 ml) foi adicionada a 2,5 ml de tampão fosfato (0,2M, pH 6,6) e 2,5 ml de ferrocianeto de potássio 1%. Esta mistura foi incubada a 50°C por 20 minutos, e em seguida adicionou-se 2,5 ml de ácido tricloroacético 10%. Uma alíquota de 2,5 ml desta solução foi adicionada a 2,5 ml de água destilada e 0,5 ml de solução FeCl<sub>3</sub> 0,1%.

A absorbância foi lida em comprimento de onda de 700 nm, e o poder redutor expresso em equivalente de ácido ascórbico (ASE ml<sup>-1</sup>). ASE ml<sup>-1</sup> indica que 1 ml da amostra apresenta o mesmo poder redutor que a mesma quantidade de ácido ascórbico.

### 4.2.4 Capacidade antioxidante total

Este teste mede a habilidade de um composto antioxidante seqüestrar o cátion ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) em comparação ao composto padrão Trolox®. A metodologia utilizada foi proposta por Re *et al.* (1999).

A metodologia ABTS<sup>•+</sup> original foi baseada na ativação da metamioglobina com peróxido de hidrogênio, na presença ou ausência de antioxidantes, para produzir um radical cátion. Hoje, a metodologia envolve a produção direta do cromóforo ABTS<sup>•+</sup>, com tonalidade azul esverdeada através da reação entre ABTS e persulfato de potássio. Esta técnica espectrofotométrica mede a habilidade relativa de antioxidantes de seqüestrar o ABTS<sup>•+</sup> em comparação ao potencial antioxidante de quantidades padrão de Trolox®. Trolox® é um análogo da vitamina E, solúvel em água, e o cátion ABTS<sup>•+</sup> é um cromóforo azul esverdeado

com características de absorção a 734 nm, que quando é reduzido a ABTS, perde sua coloração. Os resultados são expressos em mmol de Trolox/l de amostra.

Em resumo, o monócation  $ABTS^+$  é gerado a partir da oxidação do ABTS com persulfato de potássio e reduzido na presença de compostos antioxidantes capazes de doar hidrogênio. Esta metodologia mede a atividade antioxidante, determinada pela descolorização do  $ABTS^+$  medida através da redução do radical cation expressa em porcentagem de inibição da absorbância a 734 nm. A taxa de descolorização é função da concentração e tempo, e relaciona-se à reatividade do Trolox®, sob as mesmas condições.

Para o preparo da solução de  $ABTS^+$  fez-se a dissolução do ABTS em água na concentração de 7 mM, e misturou-se com persulfato de potássio 2,45 mM. A mistura foi deixada no escuro por 12 a 16h. Diluiu-se a solução com etanol até atingir a absorbância de  $0,70 \pm 0,02$  a 734 nm, e a amostra foi diluída de forma que ao colocar 10  $\mu$ l dela na solução fosse possível obter 20 a 80% da absorbância em relação ao branco.

A curva padrão foi feita com 1,0 ml do  $ABTS^+$  diluído em 10  $\mu$ l de Trolox® até concentração de 15  $\mu$ M.

#### 4.2.5 Atividade Redutora do Cobre

A atividade antioxidante de compostos fenólicos pode ser determinada através de sua atividade redutora sobre  $Cu^{2+}$ . A metodologia utilizada foi baseada no método CRAI (índice da atividade redutora do cobre), proposto por Rufián-Henares (2006).

Este teste mede a redução de  $Cu^{2+}$  e formação de  $Cu^+$  na presença de antioxidantes. Inicialmente prepara-se uma solução contendo 100  $\mu$ l de solução aquosa  $CuSO_4$  (20 mM) e 5 ml da amostra previamente dissolvida em água (1:10). Após 10 minutos adiciona-se 250  $\mu$ l de DDTTC 1% e 250  $\mu$ l de solução  $NH_3$  30%. Agitar a mistura no vórtex por 5 segundos para formar  $Cu^{2+}$ -DDTC, que é um

complexo insolúvel, e centrifugar a temperatura ambiente por 5 minutos (10000 rpm). A quantificação do  $\text{Cu}^+$  foi feita através da medida da absorbância no sobrenadante a 450 nm. Para construir a curva padrão foi utilizado Trolox®, até concentração de 1,15 mM.

### **4.3 TRATAMENTO ESTATÍSTICO**

Todos os testes foram realizados em duplicata e avaliados estatisticamente, utilizando-se o software Statistica versão 5.5. Para cada resultado expressou-se a média, desvio padrão e comparação entre as médias determinada através de Teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

## **4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.4.1 Compostos Fenólicos Totais**

As amostras A, B e C apresentaram uma redução na concentração de fenóis totais após 16 dias de estocagem, mantendo-se praticamente estável após este período (Tabela 4.2; Figura 4.1).

Durante todo o período de estocagem a amostra C apresentou concentração de fenóis superior às demais amostras (Tabela 4.3).

**Tabela 4.2** Concentração de compostos fenólicos totais durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	408±6 a	375±11 a	439±1 a
16	259±13 b	234±1 b	304±1 bcf
27	249±10 b	237±3 b	297±9 cf
35	268±14 b	246±7 bc	301±8 bcf
44	271±1 b	267±2 d	334±3 de
54	268±3 b	258±1 cd	338±1 d
64	269±4 b	263±1 cd	324±7 deg
74	264±1 b	248±2 bc	317±1 bce
80	245±2 b	215±2 e	293±4 f
88	262±5 b	248±1 bc	309±1 bcef
98	273±2 b	258±2 cd	316±1be
105	263±4 b	257±7 cd	313±1 bcg
120	262±6 b	247±2b c	302±1 bcf

Concentração de fenóis totais é expressa em mg de ácido gálico / l de amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

A concentração de compostos fenólicos totais no início do envelhecimento variou entre 375 e 439 mg/l, e apresentou valores comparáveis aos da literatura. Freitas (2006) determinou a concentração de fenóis totais em cervejas claras brasileiras e obteve valores entre 250 e 535 mg/l. Lugasi (2003) avaliou cervejas do tipo *lager* europeias de origem variada, e obteve concentrações entre 270 e 470 mg/l.

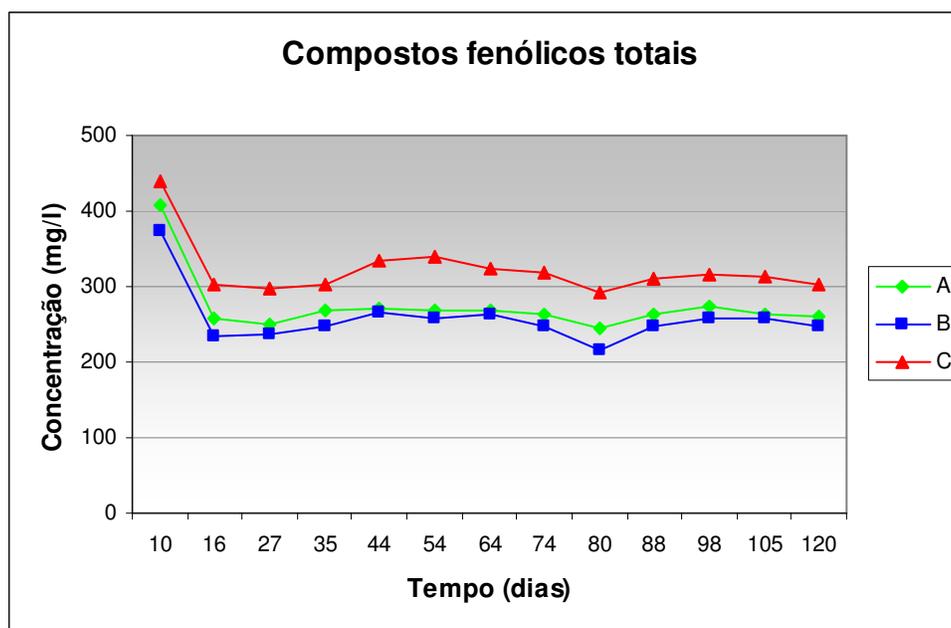
**Tabela 4.3** Concentração de compostos fenólicos totais durante envelhecimento natural: comparação entre as amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	408±6 a	375±11 b	439±1 c
16	259±13 a	234±1 a	304±1 b
27	249±10 a	237±3 a	297±9 b
35	268±14 a	246±7 a	301±8 b
44	271±1 a	267±2 a	334±3 b
54	268±3 a	258±1 b	338±1 c
64	269±4 a	263±1 a	324±7 b
74	264±1 a	248±2 b	317±1 c
80	245±2 a	215±2 b	293±4 c
88	262±5 a	248±1 b	309±1 c
98	273±2 a	258±2 b	316±1 c
105	263±4 a	257±7 a	313±1 b
120	262±6 a	247±2 b	302±1 c

Concentração de fenóis totais é expressa em mg de ácido gálico / l de amostra. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

A amostra C apresentou a maior concentração de compostos fenólicos, fato que deve ser atribuído principalmente à matéria-prima utilizada, que é diferente da matéria-prima empregada nas amostras A e B. Lermusieau *et al.* (2001) avaliou a concentração de compostos fenólicos totais e flavonóides em diferentes variedades de lúpulo e observou diferenças entre as amostras de até 250% no teor destes compostos. Portanto, o emprego de diferentes variedades de lúpulo na produção de cervejas pode apresentar diferenças na concentração de fenóis totais no produto final.

A amostra B apresentou menor concentração de fenóis que a amostra A, mesmo tendo sido submetida ao processo de estabilização com uso de sílica. Desta forma, o processo de estabilização da cerveja parece não ter efeito na concentração total de compostos fenólicos. Apesar da matéria-prima utilizada na produção das cervejas A e B ser a mesma, a diferença observada na concentração final de compostos fenólicos pode ser devido a outras variáveis de processo, já que as amostras são produzidas em fábricas diferentes.



**Figura 4.1** Perfil da concentração de compostos fenólicos durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

A queda na concentração de fenóis totais até o 16º dia foi de aproximadamente 35%, e pode estar associada a uma maior taxa de oxidação dos compostos fenólicos nos primeiros dias de envelhecimento. As alterações que

ocorrem durante o envelhecimento da cerveja devido à oxidação ainda não estão completamente elucidadas, mas acredita-se que as principais causas das transformações nos compostos fenólicos são sua polimerização e formação de compostos de maior peso molecular, reações que podem ser induzidas na presença de acetaldeído, ou degradação dos fenóis através da abertura do anel fenólico (Vanderhaegen *et al.*, 2006).

A metodologia de Folin-Ciocalteu para determinação da concentração de compostos fenólicos totais quantifica a massa total de compostos fenólicos presentes numa mistura, e conseqüentemente uma polimerização destes compostos não afetaria sua determinação. A observação do perfil da concentração de fenóis totais, que se manteve constante a partir de 16 dias de estocagem, comparado aos perfis da capacidade antioxidante ou redutora da cerveja, que apresentaram significativa queda ao longo do envelhecimento, pode ser explicada por tal fato. Este mesmo fenômeno foi observado por Vanderhaegen *et al.* (2003) ao determinar a concentração de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante em cervejas frescas, estocadas a 20 e 40 °C durante 180 dias.

Neste estudo também foi observado que a concentração de compostos fenólicos totais nas cervejas envelhecidas se mantinha constante, enquanto a capacidade antioxidante decrescia em relação à amostra fresca. A concentração de flavonóides avaliada por este grupo também foi menor nas cervejas envelhecidas, confirmando sua polimerização ao longo do envelhecimento, e o fato da metodologia de Folin-Ciocalteu não separar flavonóides de outros polifenóis.

#### 4.4.2 Capacidade de seqüestrar radicais livres

O valor de EC50, que representa o volume de amostra necessário para reduzir 50% do radical DPPH, aumentou significativamente nos últimos dias de estocagem comparados aos primeiros dias, para as três amostras (Tabela 4.4; Figura 4.2), indicando a necessidade de um volume maior de amostra para obter a mesma redução do radical livre, e conseqüentemente menor capacidade antioxidante das amostras.

As amostras não apresentaram diferença significativa entre si, exceto para o último dia de envelhecimento, no qual a amostra B apresentou menor capacidade antioxidante que as demais (Tabela 4.5).

**Tabela 4.4** Capacidade de seqüestrar radicais livres durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

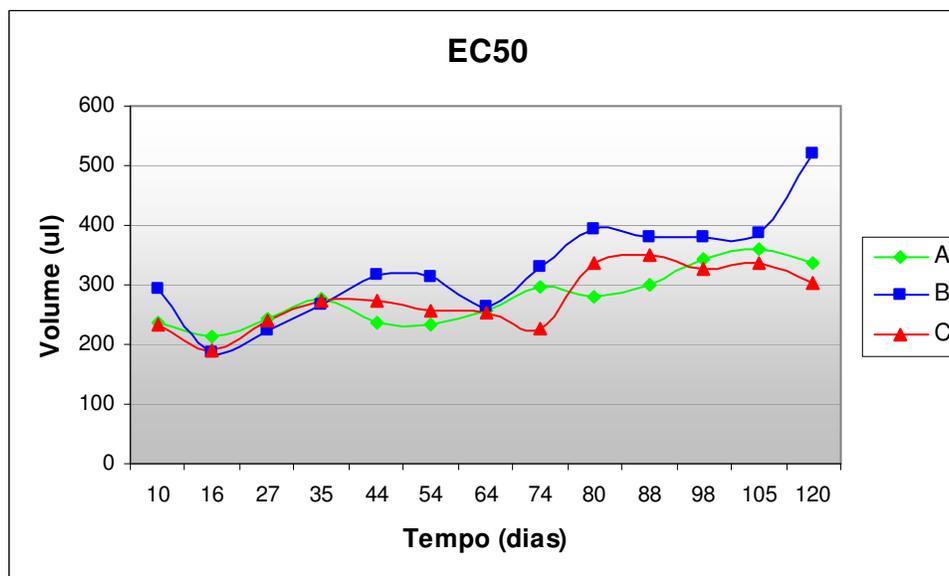
Dia	Amostra		
	A	B	C
10	237±10 ad	293±12 ad	233±10 ab
16	214±12 a	187±8 b	188±8 a
27	245±10 ab	223±9 bc	239±10 b
35	276±13 bc	267±17 ad	273±14 cde
44	235±10 ad	316±13 ad	273±12 bce
54	233±10 ad	313±13 ad	257±11 bce
64	256±11 abc	255±14 ac	253±11 bc
74	298±13 ce	330±14 df	228±10 ab
80	279±12 bcd	392±17 e	336±14 de
88	300±13 ce	381±16 ef	348±10 de
98	343±15 ef	381±16 ef	326±14 de
105	358±15 f	388±16 ef	335±14 de
120	338±14 ef	520±19 g	304±13 e

EC50 é expresso em µl de amostra necessária para reduzir 50% do DPPH. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.5** Capacidade de seqüestrar radicais livres durante envelhecimento natural: comparação entre as amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	237±10ab	293±12a	233±10b
16	214±12a	187±8a	188±8a
27	245±10a	223±9a	239±10a
35	276±13a	267±17a	273±14a
44	235±10a	316±13b	273±12ab
54	233±10a	313±13a	257±11ab
64	256±11a	255±14a	253±11a
74	298±13a	330±14a	228±10b
80	279±12a	392±17b	336±14ab
88	300±13a	381±16b	348±10ab
98	343±15a	381±16a	326±14a
105	358±15a	388±16a	335±14a
120	338±14a	520±19b	304±13a

EC50 é expresso em µl de amostra necessária para reduzir 50% do DPPH. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

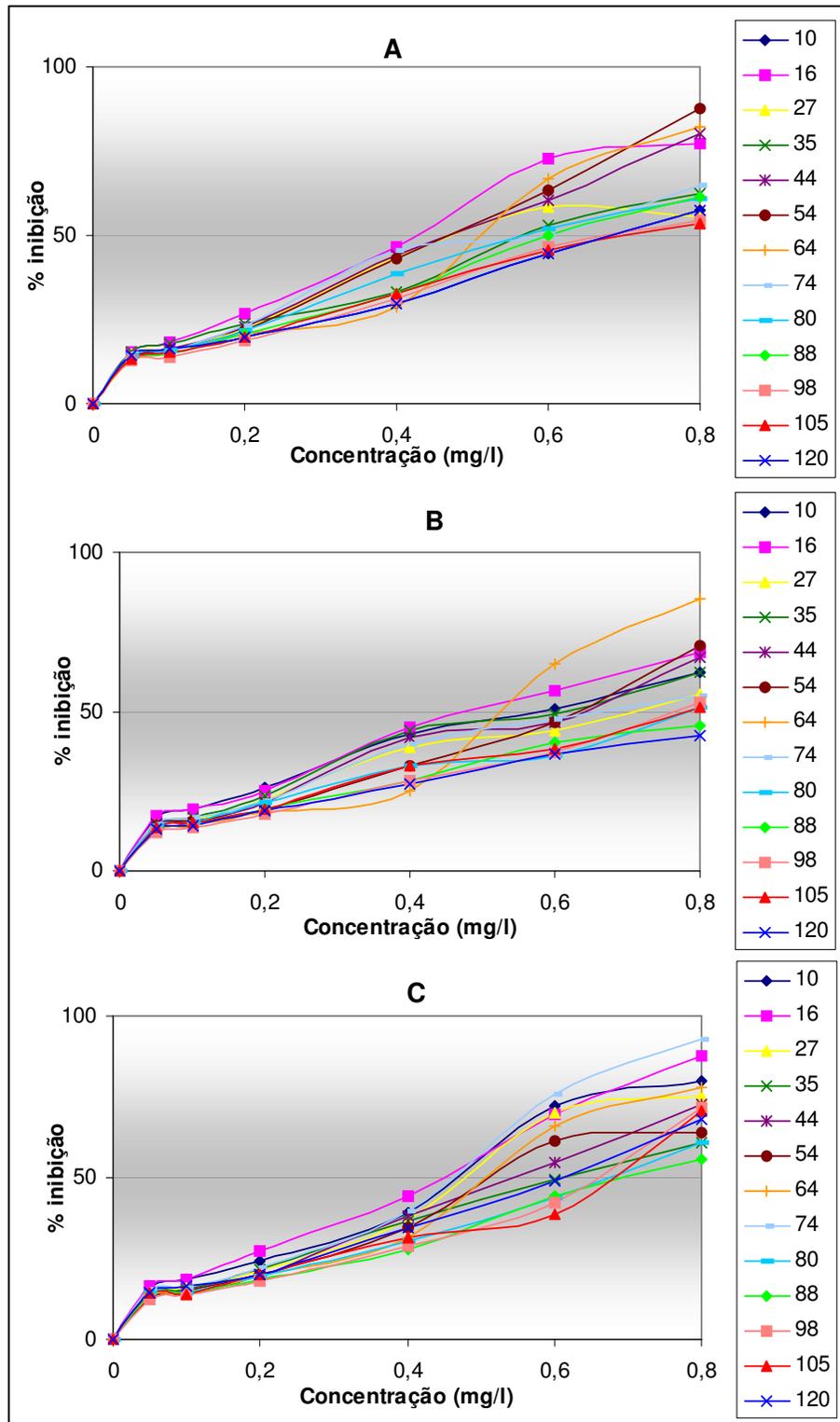


**Figura 4.2** Perfil dos valores de EC50 durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

A capacidade de seqüestrar radicais livres apresentou valores de EC50 entre 233 e 293 µl no início do processo de envelhecimento, apresentando correlação linear com a concentração de compostos fenólicos ( $y = -0,945x + 639,14$ ,  $R^2 = 0,8053$ ). Os valores encontrados foram mais elevados que os obtidos por Lugasi (2003), indicando menor habilidade de seqüestrar radicais livres, já que o volume de amostra necessário para reduzir o radical livre é inversamente proporcional à capacidade seqüestrante da mesma. Tal fato pode ser explicado pela natureza dos compostos fenólicos, determinada pelo tipo de lúpulo e cereal utilizados, já que cada composto possui características antioxidantes específicas.

A observação das curvas de porcentagem de inibição do radical DPPH (Figura 4.3) nos permite verificar que o volume de amostra necessário para reduzir 50% do DPPH é diretamente proporcional à idade da amostra. O perfil da porcentagem de inibição do DPPH da amostra B mostra que no final do período de envelhecimento esta amostra não conseguiu atingir 50% de redução do radical com as concentrações utilizadas nos testes. Este fato confirma a tendência da amostra B de apresentar menor capacidade de seqüestrar radicais livres no final do período de estocagem (Figura 4.2).

De modo geral, a capacidade de seqüestrar radicais livres diminui após 80 dias de envelhecimento, provavelmente devido à oxidação de compostos antioxidantes.



**Figura 4.3** Perfil da % de inibição do radical DPPH durante envelhecimento natural. (A) amostra A, (B) amostra B, (C) amostra C.

Os números da legenda representam os dias de estocagem.

### 4.4.3 Capacidade antioxidante total

Os resultados obtidos mostram a existência de três faixas distintas para a capacidade antioxidante. No início da estocagem os valores são maiores, indicando uma maior capacidade antioxidante. Após 27 dias, as amostras permaneceram praticamente constantes até 90 dias de estocagem, e apresentaram uma queda da capacidade antioxidante total nos últimos dias de armazenamento (Tabela 4.6; Tabela 4.7; Tabela 4.8; Figura 4.4).

Nos primeiros 16 dias de envelhecimento, as três amostras não apresentaram diferenças significativas. Depois deste período, a amostra C apresentou concentração equivalente superior às demais, mostrando ter maior capacidade antioxidante (Tabela 4.9; Tabela 4.10; Tabela 4.11). Comparando os dados obtidos após 1, 4 e 7 minutos de reação, pode ser observado um aumento na capacidade antioxidante proporcional ao tempo de reação em todas as amostras. Entre 1 e 4 minutos as amostras A e B apresentaram um aumento de até 20% nos primeiros 35 dias, e um aumento superior, de cerca de 35% após 90 dias de estocagem. A amostra C apresentou aumento percentual menor, entre 5 e 10% no início do envelhecimento e entre 10 e 20% no final. O aumento da capacidade antioxidante entre 4 e 7 minutos foi praticamente constante para a amostra C, entre 10 e 15%; enquanto as amostras A e B apresentaram um crescimento gradativo do percentual de aumento da capacidade antioxidante entre o início e o final do envelhecimento, variando de 3 a 15%.

A diferença da capacidade antioxidante entre 1 e 7 minutos de reação foi maior no final do período de estocagem, após 90 dias.

**Tabela 4.6** Capacidade antioxidante total em 1 minuto de reação durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1061±29 a	1052±32 a	1018±10 a
16	878±10 b	972±30 ab	1003±44 a
27	777±26 bc	919±19 b	1008±13 a
35	713±11 cd	683±23 cd	777±12b c
44	634±1 de	669±7 ce	695±1 b
54	700±17 cd	733±16 cd	830±39 cd
64	780±52 bc	751±1 cd	853±11 cd
74	788±14 bc	725±16 cd	784±13 bc
80	693±49 cd	774±27 d	888±13 d
88	767±15 c	795±29 d	907±22 d
98	718±7 cd	762±10 d	823±17 cd
105	577±27 e	586±18 e	693±20 b
120	408±33 f	571±15 e	698±41 b

Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.7** Capacidade antioxidante total em 4 minutos de reação durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1190±25 a	1147±28 a	1069±9 a
16	1028±9 b	1078±26 b	1055±40 a
27	938±23 bc	1032±16 b	1060±11 a
35	881±10 cde	827±20 cf	852±11 b
44	811±1 cf	814±6 cdf	829±1 b
54	870±15 cd	870±14 c	956±33 c
64	941±46 bd	751±1 de	883±11 bc
74	947±13 bd	727±15 e	850±12 b
80	864±44 cdf	772±25 ed	943±12 c
88	1014±32 b	1024±11 b	1110±21 a
98	975±6b e	947±5 g	962±4 c
105	772±3 fg	792±19 ef	853±8 b
120	681±28 g	811±12 cdf	860±37 b

Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.8** Capacidade antioxidante total em 7 minutos de reação durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1213±22 a	1178±25a	1191±8a
16	1072±8 b	1118±23ab	1178±37a
27	994±20 bc	1077±14b	1182±11a
35	945±9 cd	898±18 cd	926±78 b
44	884±1 c	886±6 cd	987±1 bc
54	935±13 cd	935±12 c	1092±30 cd
64	996±40 bd	863±1 d	1002±10 bce
74	1002±11 bd	840±14 d	906±12 b
80	929±38 cd	882±24 cd	1046±11 ce
88	1198±14 a	1089±33 b	1204±16 ad
98	1051±6 b	1098±12 b	1100±6 ade
105	881±29 c	875±8 cd	994±5 bce
120	791±24 e	887±11 cd	996±35 bce

Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra. Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.9** Capacidade antioxidante total em 1 minuto de reação durante envelhecimento natural: comparação entre as amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1061±29 a	1052±32 a	1018±10 a
16	878±10 a	972±30 a	1003±44 a
27	777±26 a	919±19 b	1008±13 c
35	713±11 ab	683±23 a	777±12 b
44	634±1 a	669±7 b	695±1 c
54	700±17 a	733±16 ab	830±39 b
64	780±52 a	751±1 a	853±11 a
74	788±14 a	725±16 b	784±13 ab
80	693±49 a	774±27 ab	888±13 b
88	767±15 a	795±29 a	907±22 b
98	718±7 a	762±10 a	823±17 b
105	577±27 a	586±18 a	693±20 b
120	408±33 a	571±15 b	698±41 c

Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.10** Capacidade antioxidante total em 4 minutos de reação durante envelhecimento natural: comparação entre as amostras A, B e C.

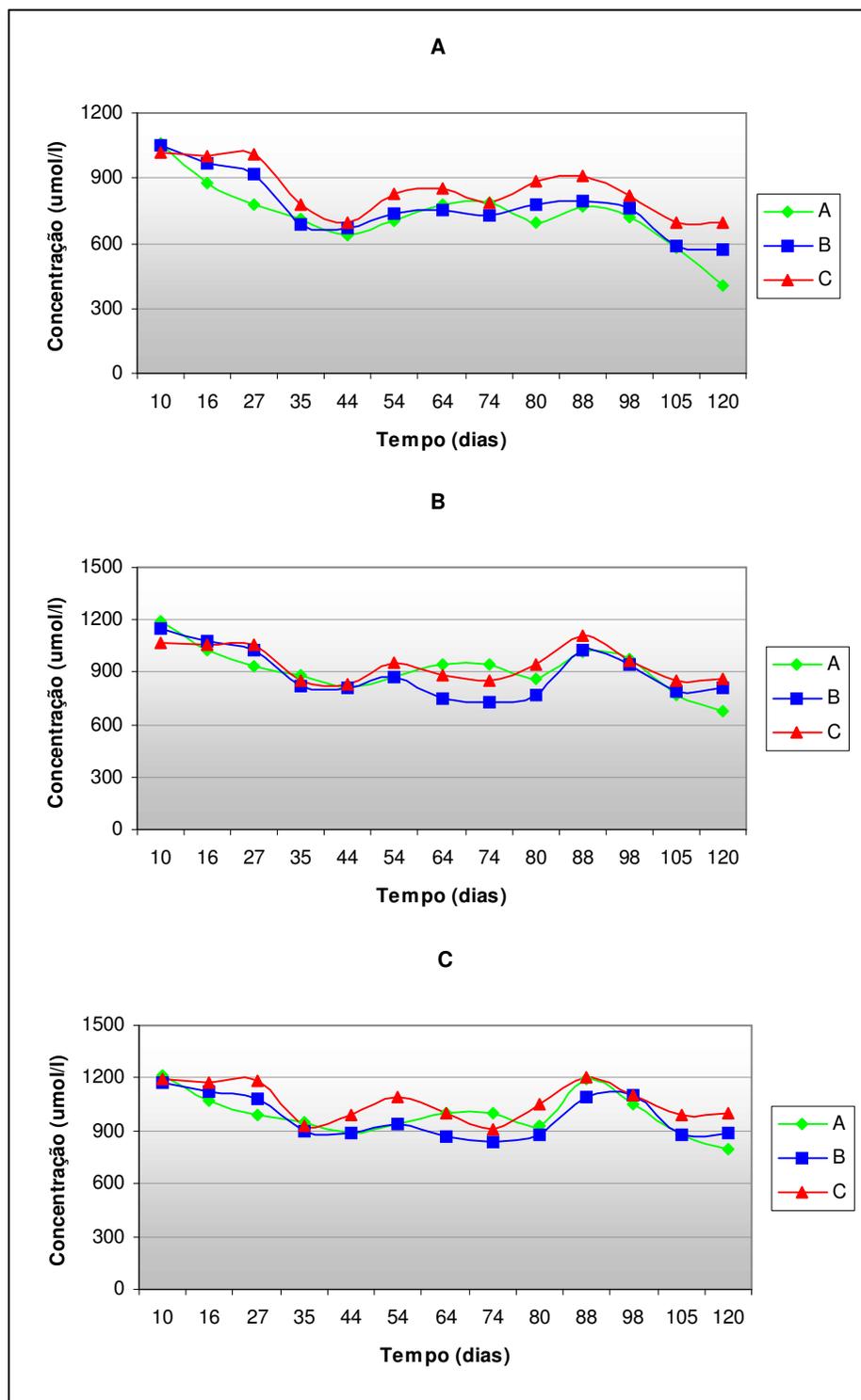
Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1190±25 a	1147±28a	1069±9b
16	1028±9 a	1078±26 a	1055±40 a
27	938±23 a	1032±16 b	1060±11 b
35	881±10 a	827±20 a	852±11 a
44	811±1 a	814±6 a	829±1 b
54	870±15 a	870±14 a	956±33 a
64	941±46 a	751±1 b	883±11 a
74	947±13 a	727±15 b	850±12 c
80	864±44 a	772±25 a	943±12 b
88	1014±32 a	1024±11 a	1110±21 a
98	975±6 a	947±5 b	962±4 ab
105	772±3 a	792±19 a	853±8 b
120	681±28 a	811±12 b	860±37 b

Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ )

**Tabela 4.11** Capacidade antioxidante total em 7 minutos de reação durante envelhecimento natural: comparação entre as amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1213±22 a	1178±25 a	1191±8 a
16	1072±8 a	1118±23 a	1178±37 a
27	994±20 a	1077±14 b	1182±11 c
35	945±9 a	898±18 a	926±78 a
44	884±1 a	886±6 a	987±1 b
54	935±13 a	935±12 a	1092±30 b
64	996±40 a	863±1 b	1002±10 a
74	1002±11 a	840±14 b	906±12 c
80	929±38 a	882±24 a	1046±11 b
88	1198±14 a	1089±33 b	1204±16 a
98	1051±6 a	1098±12 b	1100±6 b
105	881±29 a	875±8 a	994±5 b
120	791±24 a	887±11 a	996±35 b

Resultados expressos em  $\mu\text{mol}$  de Trolox / l de amostra. Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ )



**Figura 4.4** Perfil da concentração de  $ABTS^{+}$  durante envelhecimento natural das amostras A, B e C. (A) leitura realizada após 1 minuto, (B) leitura realizada após 4 minutos, (C) leitura realizada após 7 minutos

A primeira medida do ABTS<sup>+</sup> representa a ação do grupo de antioxidantes com mecanismo mais rápido e pode ser relacionada à estabilidade de sabor na cerveja. Os ensaios realizados mostraram que a amostra C apresentou menor percentual de aumento entre as medidas obtidas em 1 e 4 minutos de reação, indicando uma maior concentração de antioxidantes de mecanismo rápido. Outro fato interessante é o aumento da diferença nas concentrações obtidas entre 1 e 7 minutos no final da estocagem, refletindo uma possível queda na concentração de antioxidantes de rápido mecanismo neste período.

A capacidade antioxidante total, medida a partir do cátion ABTS<sup>+</sup>, foi bastante semelhante para as três amostras no início do envelhecimento, com valores próximos a 1050 µmol/l. Tais resultados estão dentro do intervalo encontrado por Freitas (2006), que encontrou valores entre 580 e 2020 µmol/l ao analisar cervejas claras brasileiras.

A queda da capacidade antioxidante ao longo dos 4 meses de envelhecimento foi de aproximadamente 50%, superior à queda observada na concentração de fenóis totais e na capacidade de sequestrar radicais livres. A maior sensibilidade do teste realizado com o cátion ABTS<sup>+</sup> em relação ao DPPH, que é sensível apenas a antioxidantes hidrofílicos, pode ser uma explicação para este fato.

A maior capacidade antioxidante da amostra C deve-se, provavelmente, à matéria-prima utilizada. A levedura produz sulfito, importante agente antioxidante, naturalmente durante a fermentação, e este composto permanece presente no produto final (Kaneda, 1994). A linhagem de levedura utilizada nesta amostra é diferente, e pode ter habilidade de produzir maior quantidade de SO<sub>2</sub> que a levedura utilizada nas amostras A e B. Além da linhagem de levedura, diferentes variedades de lúpulo e cevada podem apresentar diferenças na composição de compostos fenólicos, e conseqüentemente em sua capacidade antioxidante. As propriedades biológicas dos compostos fenólicos estão relacionadas com a atividade antioxidante que cada composto exerce. A atividade dos antioxidantes depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor, caracterizada pela velocidade de inativação do

radical livre, reatividade com outros antioxidantes ou habilidade de quelar de metais. Gerhäuser *et al.* (2002) avaliaram a capacidade antioxidante de diferentes compostos fenólicos em cervejas, e os compostos que apresentaram os maiores índices de redução foram o xanthohumol e isoxanthohumol, (prenil)naringenina e apigenina. O composto xanthohumol foi identificado como o mais efetivo na prevenção do câncer.

#### 4.4.4 Poder redutor

O poder redutor apresentou uma queda significativa entre 27 e 35 dias de estocagem, para todas as amostras. Após este período o poder redutor das amostras manteve-se praticamente estável, apresentando nova queda apenas no último dia de análise (Tabela 4.12; Figura 4.5).

A amostra C apresentou maior concentração equivalente durante todo o envelhecimento, exceto na última análise, na qual as amostras não apresentaram diferença significativa entre si (Tabela 4.13).

O ensaio para determinação do poder redutor, que se baseia na redução do íon férrico, apresentou diferença significativa entre as amostras no início do processo de envelhecimento, com correlação linear com a concentração de fenóis totais ( $y = 0,0033x - 0,17$ ,  $R^2 = 0,9084$ ). Os resultados encontrados neste ensaio foram inferiores aos encontrados na literatura (Lugasi, 2003), que variaram entre 1,7 e 2,5 mmol/l para cervejas do tipo *lager*.

O poder redutor também apresenta correlação linear com a capacidade seqüestrante de radicais livres ( $y = -0,0044x + 5,8127$ ;  $R^2 = 0,8188$ ), medida através da redução do DPPH.

**Tabela 4.12** Poder Redutor durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

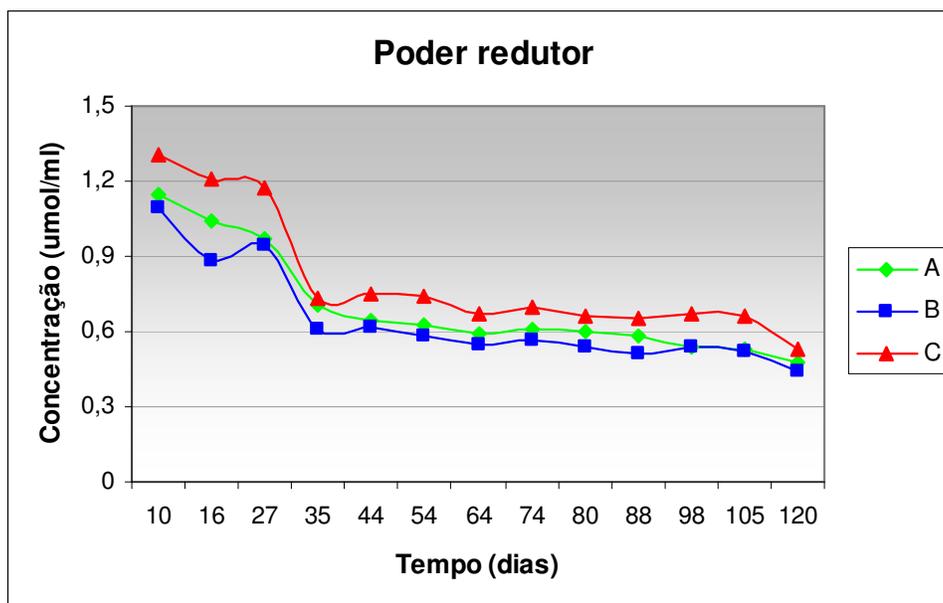
Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1,14±0,01 a	1,09±0,01 a	1,31±0,01 a
16	1,04±0,02 b	0,89±0,01 b	1,21±0,01 b
27	0,97±0,01 c	0,94±0,01 c	1,18±0,01 b
35	0,70±0,01 d	0,61±0,01 de	0,73±0,01 cd
44	0,64±0,01 e	0,62±0,02 d	0,75±0,01 c
54	0,63±0,01 e	0,58±0,01 ef	0,74±0,01 c
64	0,59±0,01 f	0,54±0,01 fg	0,67±0,02 de
74	0,61±0,01 ef	0,57±0,01 ef	0,70±0,02 cde
80	0,60±0,01 ef	0,54±0,01 fgh	0,66±0,01 de
88	0,58±0,01 f	0,51±0,01 gh	0,66±0,01 de
98	0,54±0,01 g	0,53±0,01 g	0,67±0,01 de
105	0,53±0,01 g	0,52±0,01 gh	0,66±0,01 e
120	0,47±0,01 h	0,44±0,01 i	0,53±0,04 f

Resultados expressos em equivalente de ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/ml}$ ). Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.13** Poder Redutor durante envelhecimento natural: comparação entre as amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	1,14±0,01a	1,09±0,01b	1,31±0,01c
16	1,04±0,01a	0,89±0,01b	1,21±0,01c
27	0,97±0,01a	0,94±0,01a	1,18±0,01b
35	0,70±0,01a	0,61±0,01b	0,73±0,01a
44	0,64±0,01a	0,62±0,02a	0,75±0,01b
54	0,63±0,01a	0,58±0,01b	0,74±0,01c
64	0,59±0,01a	0,54±0,01a	0,67±0,02b
74	0,61±0,01a	0,57±0,01a	0,70±0,02b
80	0,60±0,01a	0,54±0,01b	0,66±0,01c
88	0,58±0,01a	0,51±0,01b	0,66±0,01c
98	0,54±0,01a	0,53±0,01a	0,67±0,01b
105	0,53±0,01a	0,52±0,01a	0,66±0,01b
120	0,47±0,01a	0,44±0,01a	0,53±0,04a

Resultados expressos em equivalente de ácido ascórbico ( $\mu\text{mol/ml}$ ). Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 4.5** Perfil do poder redutor das amostras A, B e C durante envelhecimento natural.

O poder redutor está relacionado à capacidade antioxidante secundária do produto, e seu perfil foi semelhante ao encontrado nos outros testes de determinação da capacidade antioxidante, realizados com o radical DPPH e ABTS<sup>•+</sup>. Uma queda acentuada na capacidade antioxidante e no poder redutor foi observada após 30 dias de envelhecimento e verifica-se uma nova tendência de queda após 100 dias de estocagem.

#### 4.4.5 Atividade Redutora do Cobre

As três amostras apresentaram queda no índice de atividade redutora do cobre até o 54<sup>o</sup> dia de estocagem. Após este período, o índice de atividade redutora do cobre voltou a crescer, apresentando uma curva ascendente até 80 dias de estocagem. Deste ponto até o final do envelhecimento a concentração relativa se manteve significativamente constante (Tabela 4.14; Figura 4.6).

A amostra B apresentou índices menores que as demais amostras, principalmente na primeira metade do período de envelhecimento, indicando um menor poder redutor, ou seja, menor formação de  $\text{Cu}^+$ . Após 80 dias de estocagem as amostras não apresentaram diferenças significativas entre si (Tabela 4.15).

**Tabela 4.14** CRAI (Índice de atividade redutora do cobre) durante envelhecimento natural das amostras A, B e C.

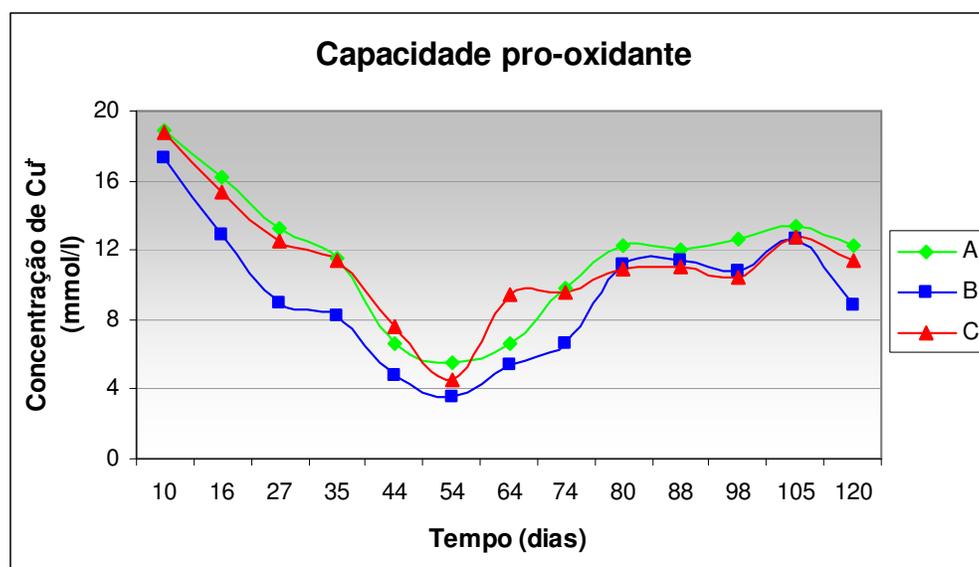
Dia	Amostra		
	A	B	C
10	19±1 a	17,3±0,4 a	18,8±0,5 a
16	16,2±0,8 ab	12,9±0,1 b	15±2 ab
27	13,3±0,2 bc	9±0,5 cd	12,6±0,4 bc
35	11,5±0,4 c	8,2±0,6 ce	11±1 c
44	6,6±0,6 de	5±1 fg	7,6±0,5 de
54	5,5±0,1 d	3,5±0,1 f	4,5±0,3 e
64	6,6±0,5 de	5,4±0,6 fg	9,4±0,8 cd
74	9,9±0,2 ce	6,6±0,4 eg	9,6±0,6 cd
80	12,3±0,5 c	11,2±0,1 bdh	11,0±0,3 cd
88	12±2 c	11,4±0,3 b	11±1 cd
98	13±2 bc	10,8±0,3 bd	10±1 cd
105	13,4±0,2 bc	12,6±0,9 b	13±1 bc
120	12±1 c	8,9±0,2 cde	11±1 cd

Resultados expressos em mmol de Trolox / ml de amostra  
Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).

**Tabela 4.15** CRAI (Índice de atividade redutora do cobre) durante envelhecimento natural: comparação entre as amostras A, B e C.

Dia	Amostra		
	A	B	C
10	19±1 a	17,3±0,4 a	18,8±0,5 a
16	16,2±0,8 a	12,9±0,1 a	15±2 a
27	13,3±0,2 a	9±0,5 b	12,6±0,4 a
35	11,5±0,4 a	8,2±0,6 b	11,4±1 a
44	6,6±0,6 a	5±1 a	7,6±0,5 a
54	5,5±0,1 a	3,5±0,2 b	4,5±0,3 c
64	6,6±0,5 a	5,4±0,6 a	9,4±0,8 b
74	9,9±0,2 a	6,6±0,4 b	9,6±0,6 a
80	12,3±0,5 a	11,2±0,1 a	11±0,3 a
88	12±2 a	11,4±0,3 a	11±1 a
98	13±2 a	10,8±0,3 a	10±1 a
105	13,4±0,2 a	12,6±0,9 a	13±1 a
120	12±1 a	8,9±0,2 a	11±1 a

Resultados expressos em mmol de Trolox / ml de amostra  
Letras iguais na mesma linha não diferem significativamente entre si ( $p \leq 0.05$ ).



**Figura 4.6** Perfil da atividade redutora do cobre das amostras A, B e C durante envelhecimento natural, medida através da concentração de  $\text{Cu}^+$ .

O aumento na concentração de  $\text{Cu}^+$  é diretamente proporcional ao aumento da concentração de compostos fenólicos, segundo Rufián-Henares (2006). O íon cobre naturalmente encontrado nos alimentos é o  $\text{Cu}^{2+}$ , que pode ser reduzido na presença de compostos antioxidantes. Neste estudo observou-se uma diminuição na quantidade de  $\text{Cu}^+$  formado durante os 40 primeiros dias de envelhecimento, provavelmente devido à redução na concentração de compostos fenólicos. Após este período a taxa de redução do  $\text{Cu}^{2+}$  aumentou, permanecendo constante até o final do período de envelhecimento. Esta mudança no comportamento da curva, ou seja, o aumento do poder redutor do cobre após 50 dias, pode ser devido às alterações na composição dos compostos fenólicos do produto ou ao aparecimento de outros compostos redutores, como produtos da reação de Maillard, que podem ser formados durante o envelhecimento da cerveja (Vanderhaegen *et al.*, 2006). Compostos fenólicos monoméricos têm menor índice de redução do íon cobre que polifenóis ou complexos formados entre compostos fenólicos e proteínas (Rufián-Henares, 2006).

Uma possível explicação para este perfil é que no início do envelhecimento há um alto índice de complexações do íon  $\text{Cu}^{2+}$ , presente naturalmente nos alimentos, e conseqüentemente uma diminuição do índice de redução deste íon. Entre 50 e 80 dias de envelhecimento, observa-se um novo aumento na concentração de íons  $\text{Cu}^+$ , fato que talvez seja atribuído ao aumento do teor de melanoidinas, provenientes da reação de Maillard, que também possuem forte capacidade de quelar íons cobre (Oñate-jaén *et al.*, 2006). A partir de 80 dias de estocagem essa concentração se torna constante até o final do envelhecimento, quando volta a mostrar uma tendência de queda, semelhantemente à capacidade antioxidante e poder redutor.

## 4.5 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

A queda acentuada da concentração de fenóis totais nos primeiros 16 dias de estocagem foi um padrão que se repetiu nos 3 tipos de cerveja, independentemente do processo de estabilização ou da matéria-prima (levedura, lúpulo ou cereal) empregada.

Os três testes realizados para determinação da capacidade antioxidante da amostra (DPPH, ABTS<sup>+</sup> e poder redutor) apresentaram perfis semelhantes ao longo do processo de envelhecimento. Observa-se uma diminuição na capacidade antioxidante nos primeiros dias de estocagem e uma nova queda no final do período. A análise dos perfis da concentração de fenóis totais e capacidade antioxidante, medidas de diferentes formas, nos permite identificar que as principais mudanças de comportamento das curvas ocorrem até os 15 primeiros dias, entre 30 e 40 dias, e após 100 dias de estocagem

Diversos estudos relacionados à atividade antioxidante da cerveja correlaciona esta propriedade à composição da cerveja (Maillard *et al.*, 1996; Lugasi, 2003; Oñate-Jaén *et al.*, 2006). Diversos fatores, além da concentração de compostos fenólicos podem influenciar na atividade antioxidante de um produto. A presença de sulfitos, naturalmente formados ou adicionados ao produto, a presença de íons metálicos como o Fe<sup>+3</sup> e Cu<sup>+2</sup>, formação de melanoidinas e outros produtos resultantes da reação de Maillard e a composição dos compostos fenólicos são alguns destes fatores (Oñate-Jaén *et al.*, 2006; Vanderhaegen, 2006).

Produtos da reação de Maillard produzem efeito sinérgico em combinação com compostos fenólicos, e enquanto outros agentes antioxidantes podem ser degradados durante o processamento e estocagem, os produtos da reação de Maillard são formados ao longo do envelhecimento e têm habilidade de complexar íons metálicos.

Sulfitos são formados naturalmente na cerveja através da conversão de sulfatos, provenientes da água e de outras matérias-primas, pela levedura.

Andersen *et al.* (2000) mostrou que a presença de sulfitos na cerveja é capaz de adiar a formação de radicais livres. Complexos formados entre sulfito e aldeídos durante a estocagem podem inibir reações com radicais livres, e adiar a degradação de compostos fenólicos (Kaneda *et al.*, 1994).

É permitido o uso de outros antioxidantes no processamento da cerveja, como o eritorbato de sódio e o ácido ascórbico (Brasil, 1973). Estes antioxidantes também têm efeito sinérgico e podem seqüestrar radicais livres ou quelar íons metálicos.

A escolha do tipo de processo de estabilização da cerveja parece não ter influência na concentração de compostos fenólicos ou na capacidade antioxidante. Gerhäuser *et al.* (2002) analisou a composição de fenóis retidos pelo PVPP e presentes em cervejas não estabilizadas. Os compostos retidos são em sua maioria ácido fenólicos, e verificou-se que os fenóis de maior capacidade antioxidante, como xanthohumol e prenilnaringenina não são retidos pelo PVPP.

## **CAPÍTULO 5. ESTABILIDADE SENSORIAL**

### **5.1 MATERIAIS**

#### **5.1.1 Amostras**

Três tipos diferentes de cerveja *pilsen* foram avaliados periodicamente durante sua vida de prateleira. Dentre as diferentes cervejas, duas são da mesma marca (A e B), porém produzidas em fábricas diferentes. Em uma delas o processo de estabilização é feito com uso de PVPP (polivinilpolipirrolidona), que retém parte dos compostos fenólicos, responsáveis pelo problema da turbidez no produto. Na outra, a estabilização é feita com sílica, que retém parte das proteínas, que ao se complexarem com os compostos fenólicos causam turbidez

no produto. No terceiro tipo de cerveja (amostra C) analisado o processo de estabilização também é feito com uso de PVPP, porém a bebida é produzida com lúpulo e linhagem de levedura diferentes das demais (A e B), sendo que a relação malte/adjunto bem como a relação lúpulo aromático/lúpulo de amargor é maior que nas demais cervejas.

As cervejas foram fornecidas pelas fábricas logo após o envase, duas marcas em embalagens de alumínio, e uma em garrafas de vidro (long neck). Os lotes foram rigorosamente escolhidos, encontrando-se dentro das especificações características de cada produto. A Tabela 5.1 mostra as características físico-químicas, fornecidas pelos fabricantes, de cada amostra. Todas as amostras foram estocadas em a temperatura ambiente e em local protegido contra a luz.

**Tabela 5.1** Características físico químicas das amostras de cerveja A, B e C.

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>
<b>Álcool (% v/v)</b>	3,66	3,75	4,05
<b>Densidade 20/4</b>	1,00813	1,00728	1,00656
<b>Calorias (Kcal/100mL)</b>	40,77	40,73	42,71
<b>Cor (EBC)</b>	5,15	4,68	7,06
<b>pH</b>	4,05	4,19	4,20
<b>Amargor (BU)</b>	9,0	10,0	17,0
<b>CO<sub>2</sub></b>	0,51	0,49	0,49
<b>Dicetonas Totais</b>	0,04	0,05	0,03
<b>Turbidez 20°C</b>	0,52	0,75	0,49
<b>Espuma (Nibem)</b>	206	192	258

### **5.1.2 Estratégia**

As amostras de cerveja foram submetidas a testes sensoriais durante 120 dias. Foram realizados 5 testes afetivos e 3 testes de análise descritiva quantitativa, dispostos periodicamente ao longo do período total de análises.

A análise descritiva quantitativa foi conduzida aos 20 dias (Tempo 1), 75 dias (Tempo 2) e 115 dias (Tempo 3) de envelhecimento. Os testes afetivos foram realizados aos 8 dias (Tempo 1), 32 dias (Tempo 2), 65 dias (Tempo 3), 90 dias (Tempo 4) e 120 dias (Tempo 5) de envelhecimento.

## **5.2 METODOLOGIA**

### **5.2.1 Análise Descritiva Quantitativa**

As avaliações sensoriais foram realizadas no Laboratório de Análise Sensorial do departamento de Nutrição da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas-SP, em cabines individuais sob condições controladas (Figura 5.2).

As amostras foram servidas em temperatura entre 2 e 5°C, em copos plásticos descartáveis de 50 ml codificados com números de 3 dígitos e apresentados de forma monádica. Foi utilizado o delineamento de blocos completos balanceados (MacFie, 1989).

As fichas de avaliação foram montadas com os atributos escolhidos com base em sua relevância no processo de envelhecimento da cerveja (Stewart 2004). Os atributos avaliados foram: aroma frutal (afru), aroma de papelão (apap), gosto doce (doce), gosto amargo (amar), sabor de papelão (spap) e sabor frutal (sfriu) (Figura 5.1). A escala utilizada foi a não estruturada de 9 cm, ancoradas nos

pontos extremos, à esquerda pelos termos “nenhum” ou “fraco” e à direita “forte” para cada atributo. A Tabela 5.2 lista os termos descritores, definições e referências utilizadas.

Provadores escolhidos entre os alunos de pós-graduação do curso de engenharia de alimentos, com experiência em análise descritiva quantitativa de cervejas, participaram de quatro sessões de treinamento com as referências para cada atributo escolhido. Após a realização do treinamento, os provadores avaliaram as amostras em quatro repetições, em ficha de avaliação específica.

Dentre todos os provadores que realizaram o teste, 12 foram selecionados com base em seu poder de discriminação entre as amostras, repetibilidade e concordância com a equipe (Damásio e Costell, 1991).

Tais parâmetros foram obtidos através de análise de variância (ANOVA) com duas fontes de variação (amostra e repetição) para cada atributo e para cada provador. Desta forma, os valores de  $F_{\text{amostra}}$  e  $F_{\text{repetição}}$  foram obtidos para cada provador.

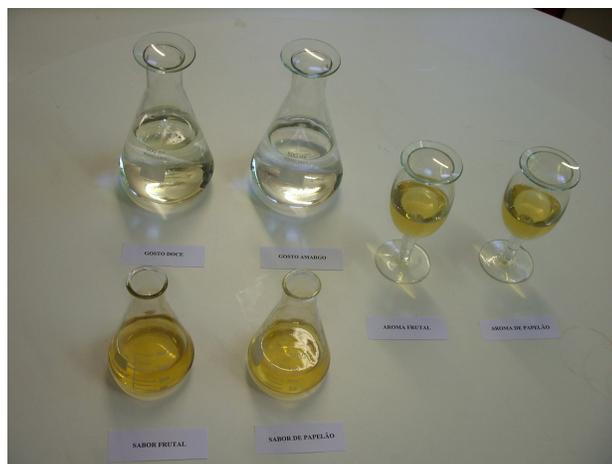
Os provadores selecionados apresentaram  $F_{\text{amostra}}$  significativo para  $p < 0,30$ ,  $F_{\text{repetição}}$  não significativo para  $p > 0,05$  e concordância das médias com as da equipe.

Através das respostas dadas, pelos 12 provadores selecionados, para quatro repetições da análise das amostras de cerveja, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) de dois fatores, amostra e provador, com interação para cada atributo; teste de Tukey para comparação das médias das amostras e análise de componentes principais (ACP).

As análises estatísticas foram realizadas através dos programas do pacote estatístico SAS (1993).

**Tabela 5.2** Definição dos termos descritores de cerveja e referências.

DESCRITORES	DEFINIÇÃO	REFERÊNCIA
<b>AROMA</b>		
Papelão	Aroma característico de papelão, específico do composto t-2-nonenal	<b>Fraco:</b> Cerveja <i>pilsen</i> com idade máxima de 15 dias, mantida sob refrigeração <b>Forte:</b> 200 µl de solução alcoólica de <i>trans</i> -2-nonenal/100ml de cerveja <i>pilsen</i> entre 1 e 15 dias de idade Solução alcóolica: 0,03 µl T-2-nonenal + 20 mL etanol 50%
Frutal	Aroma característico de frutas	<b>Nenhum:</b> água <b>Forte:</b> 10 µl de acetato de isoamila/300ml de cerveja <i>pilsen</i> entre 1 e 15 dias de idade
<b>SABOR</b>		
Gosto doce	Gosto característico de solução de sacarose	<b>Nenhum:</b> Água <b>Forte:</b> Solução a 5 % de sacarose em água
Gosto amargo	Gosto amargo característico de solução de cafeína	<b>Nenhum:</b> Água <b>Forte:</b> Solução a 0,08 % de cafeína em água
Papelão	Sabor característico de papelão, específico do composto t-2-nonenal	<b>Fraco:</b> Cerveja <i>pilsen</i> com idade máxima de 15 dias, mantida sob refrigeração <b>Forte:</b> 200 µl de solução alcoólica de <i>trans</i> -2-nonenal/100ml de cerveja <i>pilsen</i> entre 1 e 15 dias de idade Solução alcóolica: 0,03 µl T-2-nonenal + 20 mL etanol 50%
Frutal	Sabor característico de frutas	<b>Nenhum:</b> água <b>Forte:</b> 10 µl de acetato de isoamila/300ml de cerveja <i>pilsen</i> entre 1 e 15 dias de idade



**Figura 5.1** Referências utilizadas na análise descritiva quantitativa.



**Figura 5.2** Cabine utilizada para avaliação das amostras.

### 5.2.2 Teste afetivo

As análises foram realizadas por uma equipe de 118 provadores, apreciadores do produto, recrutados entre professores, alunos e funcionários da Unicamp.

As amostras foram testadas em cabines individuais localizadas no laboratório de Análise Sensorial da Faculdade de Engenharia de Alimentos - UNICAMP, em copos plásticos descartáveis com capacidade para 50mL e codificados com algarismos de três dígitos. Os atributos avaliados foram: aparência, aroma, sabor, impressão global e atitude de compra. Utilizou-se fichas de avaliação com escala hedônica não estruturada de 9 cm ancoradas nos pontos extremos para os atributos aparência, aroma, sabor e impressão global, e escala estruturada com os termos “certamente compraria”, “provavelmente compraria”, “tenho dúvidas se compraria ou não”, “provavelmente não compraria” e “certamente não compraria” para avaliar a atitude de compra. Todos os provadores provaram todas as amostras em delineamento experimental em blocos completos balanceados de forma monádica.

Os dados obtidos foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey, que permite verificar se há diferença significativa entre duas médias, ao nível de confiança de 95%. Foram avaliados também através de histogramas de distribuição de freqüências. Os histogramas tornam possível a visualização da segmentação dos valores hedônicos de cada amostra, revelando o nível de aceitação e rejeição da mesma e permitindo a comparação dos desempenhos das amostras que participaram do estudo.

Por fim foi feita análise estatística multivariada (Mapa de Preferência Interno), utilizando-se o pacote XLSTAT – Statistical Software for MS Excel, para verificar a segmentação dos consumidores e suas preferências individuais.

## **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.3.1 Análise Descritiva Quantitativa**

Os resultados indicam que as amostras (A, B e C) apresentaram um aumento no sabor e aroma de papelão ao longo do tempo. As três amostras diferem significativamente quando comparadas em relação aos testes submetidos no início e no final do envelhecimento, no entanto elas não diferem entre si quando analisadas no mesmo período de armazenamento (Tabela 5.3).

As amostras B e C também apresentaram diferenças significativas entre as análises realizadas aos 20 e 75 dias para o atributo sabor de papelão. A amostra C apresentou gosto amargo superior às demais amostras durante todo o período de envelhecimento, no entanto, assim como as demais amostras, não indicou alterações significativas neste atributo ao longo da vida de prateleira. As três amostras apresentaram aumento do gosto doce no final do período de armazenamento.

**Tabela 5.3** Médias para os atributos sensoriais das amostras A, B e C durante envelhecimento natural.

Amostra	Atributo					
	Aroma de papelão	Aroma frutal	Sabor de papelão	Gosto amargo	Gosto doce	Sabor frutal
A1	0,68 a	3,38 a	1,13 ab	4,66 a	2,74 abc	3,47 a
B1	0,91 ab	3,00 ab	1,03 a	4,73 a	2,24 a	2,96 ab
C1	1,59 abc	2,64 ab	1,47 ab	6,43 b	1,93 a	2,8 ab
A2	1,64 abcd	2,38 ab	2,70 bc	4,04 a	2,75 abc	2,23 b
B2	1,92 bcde	1,95 b	3,00 cd	4,45 a	2,59 ab	2,32 b
C2	2,16 cde	2,41 ab	3,92 cd	5,95 b	2,65 ab	2,39 b
A3	2,09 cde	2,23 b	3,24 cd	3,88 a	3,83 d	2,88 ab
B3	2,64 de	2,40 ab	4,14 d	4,10 a	3,65 cd	2,97 ab
C3	2,72 e	2,64 ab	4,35 d	5,69 b	3,46 bcd	2,61 ab
MDS	0,5456	0,6418	0,8206	0,8962	0,4749	0,5623

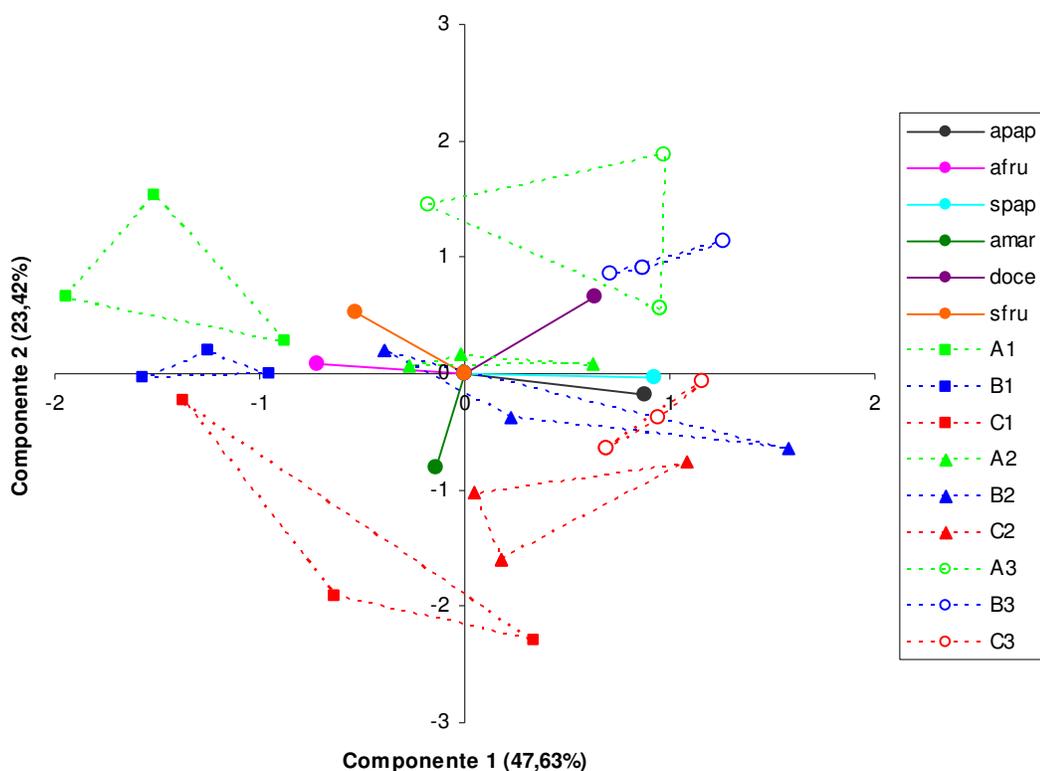
As letras na codificação das amostras representam as amostras A, B e C.

Os números representam o tempo da análise, 1: 20 dias, 2: 75 dias e 3: 115 dias.

MDS\*: diferença mínima significativa obtida no teste de médias de Tukey.

Letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

O gráfico de ACP (Figura 5.3) mostra os dois primeiros componentes principais da análise multivariada, que explicam juntos 71,05 %, evidenciando a alta explicação da variação ocorrida entre as amostras. O componente principal 1 explica 47,63% das variações entre as amostras, e tem o gosto amargo como atributo mais representativo. O componente principal 2 caracteriza 23,42% da variação entre as amostras, e os termos de maior representatividade para este componente são aroma e sabor de papelão e aroma frutal. As amostras C2 e C3 são caracterizadas pelos atributos sabor e aroma de papelão. As amostras A1 e B1 são caracterizadas pelos atributos sabor e aroma frutal. As amostras A3 e B3 apresentam maior intensidade de gosto doce. A amostra C1 foi caracterizada pelo termo gosto amargo.



**Figura 5.3** Análise de componentes principais dos termos avaliados para as amostras A, B e C durante envelhecimento natural.

As letras na codificação das amostras representam as amostras A, B e C. Os números representam o tempo da análise, 1: 20 dias, 2: 75 dias e 3: 115 dias. Apap: aroma de papelão; afru: aroma frutal; spap: sabor de papelão; amar: gosto amargo; doce: gosto doce; sfru: sabor frutal.

Durante o processo de envelhecimento todas as amostras apresentaram um aumento no aroma e sabor de papelão, que confirma a percepção sensorial do aumento da concentração do composto *trans-2-nonenal*, que é considerado o principal responsável pelo aparecimento do sabor e aroma de papelão em cervejas.

Vanderhaegen *et al.* (2003) encontrou uma concentração de 0,08 µg/l de *trans-2-nonenal* em cervejas lager frescas e aumento para 0,10 µg/l após estocagem durante 6 meses a 20°C. Lermusieau *et al.* (1999) obteve valores de

0,09 µg/l deste composto em cervejas frescas e aumento para 0,23 µg/l após envelhecimento de 3 meses em temperatura ambiente. Drost *et al.* (1989) também verificou um aumento no teor de *trans*-2-nonenal de 0,10 µg/l para até 0,20 µg/l em diferentes tipos de cerveja estocadas a 20°C durante 4 meses. Segundo Vanderhaegen *et al.* (2003) o limiar de detecção (threshold) para o *trans*-2-nonenal é de 0,11 µg/l. Desta forma pode-se explicar a baixa percepção deste composto na análise realizada aos 20 dias, e seu aumento ao longo do envelhecimento.

O composto acetato de isoamila, responsável pelo sabor e aroma a banana e referência para os termos descritores aroma e sabor frutal, apresentou redução de aproximadamente 10% em sua concentração em cervejas estocadas durante 60 dias a 30°C (Syryn *et al.*, 2007). Não foram observadas diferenças significativas ao longo do envelhecimento para os atributos aroma e sabor frutal, provavelmente devido à baixa redução no teor do composto acetato de isoamila, no entanto pode-se observar uma maior caracterização destes atributos nas amostras A1, B1 e C1 (Figura 5.3), avaliadas no início do período de envelhecimento.

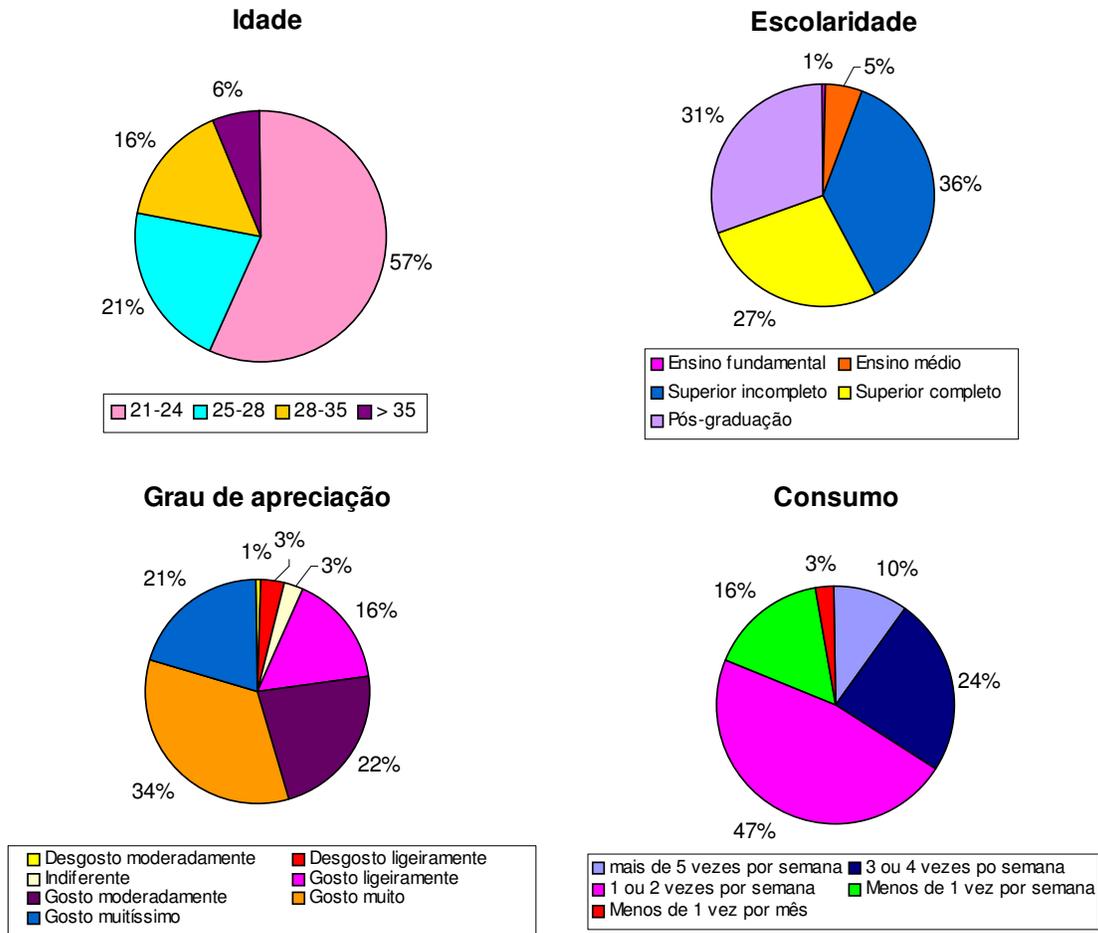
O aumento do gosto doce nos últimos dias do processo de envelhecimento pode ser devido à formação de produtos derivados da reação de Maillard, principalmente hidroximetil-furfural (Vanderhaegen *et al.*, 2006).

### 5.3.2 Teste afetivo

Foi realizada uma pesquisa com os participantes voluntários do teste, para a obtenção de algumas informações sobre o consumo e perfil dos consumidores.

Do total de participantes, 63% eram do sexo feminino e 37% do sexo masculino.

A Figura 5.4 mostra outras informações, como idade, escolaridade, grau de apreciação do produto e frequência de consumo dos consumidores participantes dos testes afetivos.



**Figura 5.4** Perfil dos consumidores que participaram do teste afetivo.

A Tabela 5.4 mostra as médias dos consumidores para cada atributo avaliado no teste afetivo. A amostra C no final do envelhecimento apresentou médias significativamente superiores às amostras A e B no início do envelhecimento. A cor mais escura pode ter influenciado na preferência dos consumidores, já que a amostra C tem coloração mais intensa que as demais

(Tabela 5.1) e essa cor também se intensifica ao longo do envelhecimento devido a formação de melanoidinas.

Em média, a preferência do consumidor em relação ao sabor do produto não foi influenciada pelo tempo de estocagem ou pelo tipo de cerveja. As amostras com maiores médias foram as amostras A e B, aos 65 e 120 dias respectivamente, que obtiveram médias entre 5,5 e 6,7.

**Tabela 5.4** Médias obtidas para a aceitação das amostras A, B e C durante envelhecimento natural.

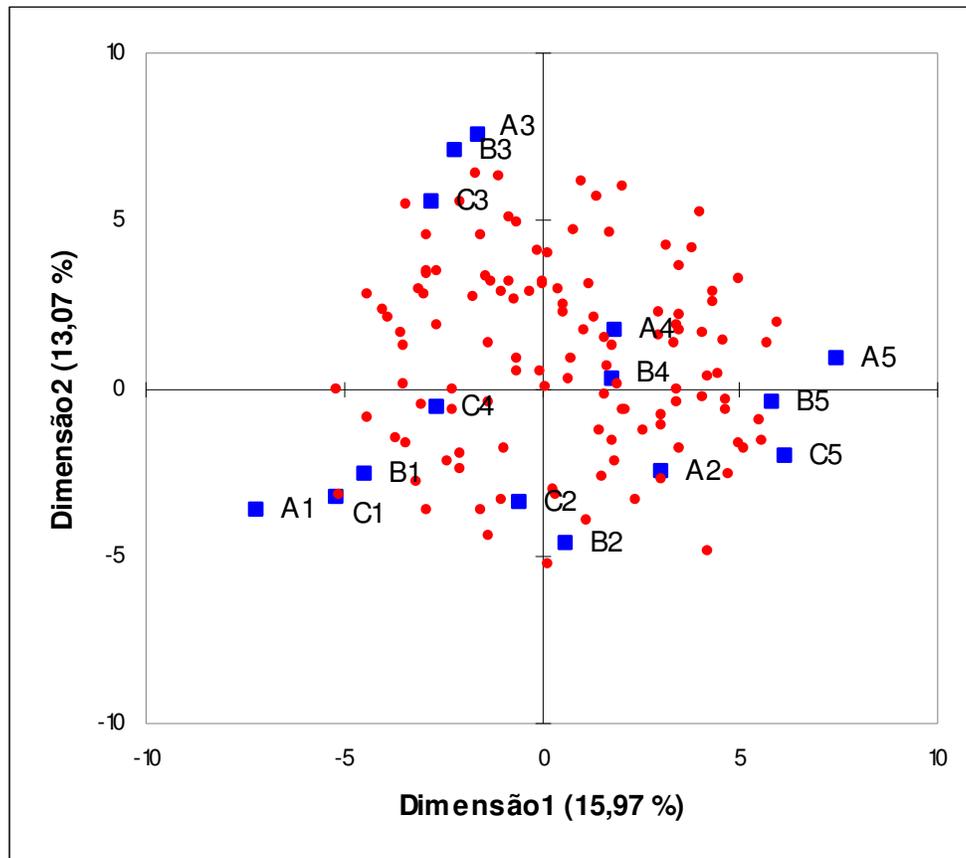
Amostra	Aparência	Aroma	Sabor	Impressão global
A1	4,83 a	4,98 abc	4,92 ab	4,88 a
B1	5,37 abc	5,02 abcd	4,94 ab	5,27 a
C1	6,07 bcd	5,01 abc	4,68 ab	4,96 a
A2	5,15 ab	4,91 ab	5,22 ab	5,29 a
B2	4,88 a	5,02 abcd	4,70 ab	4,84 a
C2	5,85 abcd	4,85 a	4,27 b	4,75 a
A3	5,75 abcd	5,83 cd	5,55 a	5,77 ab
B3	5,30 abc	5,37 abcd	5,12 ab	5,26 a
C3	6,10 bcd	5,55 abcd	5,01 ab	5,37 a
A4	5,43 abc	5,33 abcd	5,29 ab	5,33 a
B4	5,08 ab	5,21 abcd	5,10 ab	5,06 a
C4	6,20 cd	5,37 abcd	4,68 ab	5,19 a
A5	6,28 cd	5,78 bcd	5,45 ab	6,65 b
B5	5,99bcd	5,93 d	5,67 a	5,81 ab
C5	6,74 d	5,61 abcd	5,26 ab	5,22 a
MDS	1,02	0,91	1,18	1,19

As letras na codificação das amostras representam as amostras A, B e C.

Os números representam o tempo da análise, 1: 8 dias, 2: 32 dias, 3: 65 dias, 4: 90 dias e

5: 120 dias. MDS: Diferença Mínima Significativa obtida no teste de médias de Tukey ( $p > 0,05$ ).

Médias com letras iguais na mesma coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

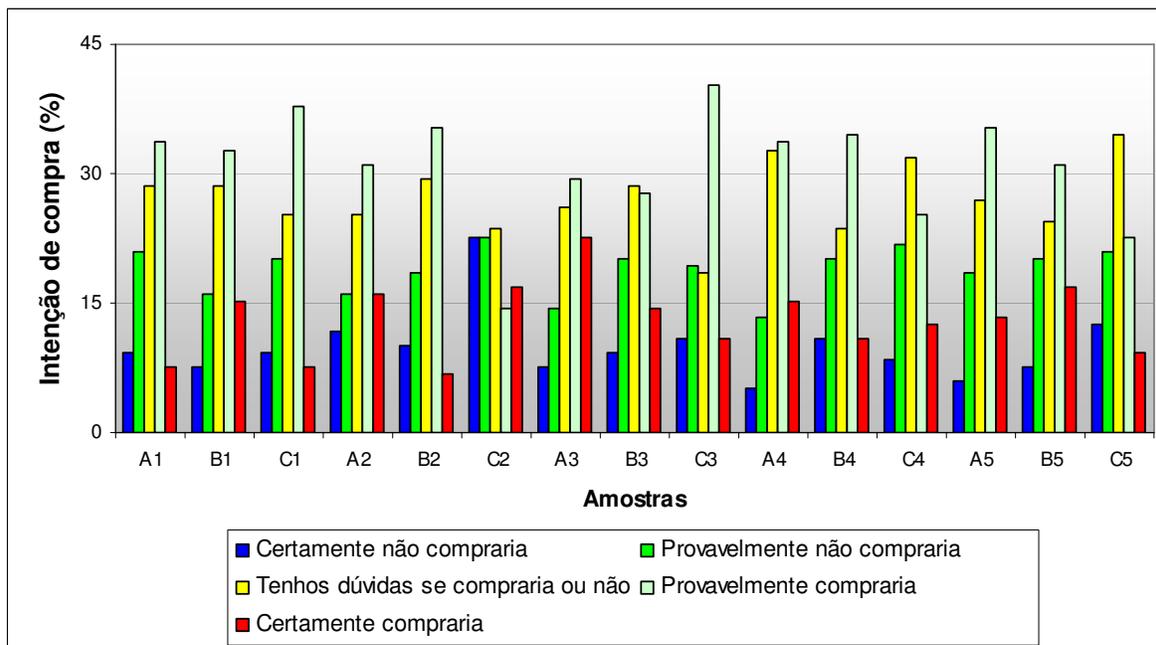


**Figura 5.5** Figura bidimensional do mapa interno de preferência. As letras na codificação das amostras representam as amostras A, B e C. Os números representam o tempo da análise, 1: 8 dias, 2: 32 dias, 3: 65 dias, 4: 90 dias e 5: 120 dias.

A Figura 5.5 apresenta as duas primeiras dimensões do mapa de preferência interno gerado a partir da matriz de correlação de Pearson das respostas hedônicas associadas às amostras de cerveja avaliadas ao longo de sua vida de prateleira. Os provadores estão representados pelos pontos vermelhos, e as amostras pelos pontos azuis. As dimensões 1 e 2 explicam juntas 29,04% da variação ocorrida entre as amostras. Neste caso pode-se observar que ocorreram muitas segmentações de consumidores, pois estes se encontram distribuídos em toda a figura, o que pode ter dificultado o resumo da informação através dos componentes principais, explicando assim a baixa porcentagem de explicação encontrada. É possível observar que as amostras estão claramente segmentadas de acordo com o período de análise. As amostras analisadas aos 8

e 32 dias de estocagem (A1, B1, C1 e A2, B2, C2) localizam-se em regiões com menor quantidade de provadores, indicando menor aceitação, enquanto as amostras analisadas aos 120 dias de estocagem (A5, B5 e C5) encontram-se em uma região com maior número de provadores, e por isso apresentam maior aceitação. As amostras A3, B3 e C3, analisadas aos 65 dias de estocagem apresentam aceitação intermediária.

A distribuição de freqüências em relação à atitude de compra dos consumidores, apresentada na Figura 5.6, não apresentou diferenças expressivas em seu perfil entre as amostras ou tempo de estocagem. A amostra A apresentou maior intenção de compra durante praticamente todo o período de envelhecimento, com uma variação de 40 a 51% de provadores que demonstraram intenção de certamente ou provavelmente comprar esta amostra. A amostra C foi a que apresentou menores percentuais, entre 31 e 51%, para estas mesmas intenções (“certamente” ou “provavelmente compraria a amostra”). A avaliação feita no Tempo 3, aos 65 dias de estocagem, foi a que obteve os maiores índices de respostas “certamente” ou “provavelmente compraria”.

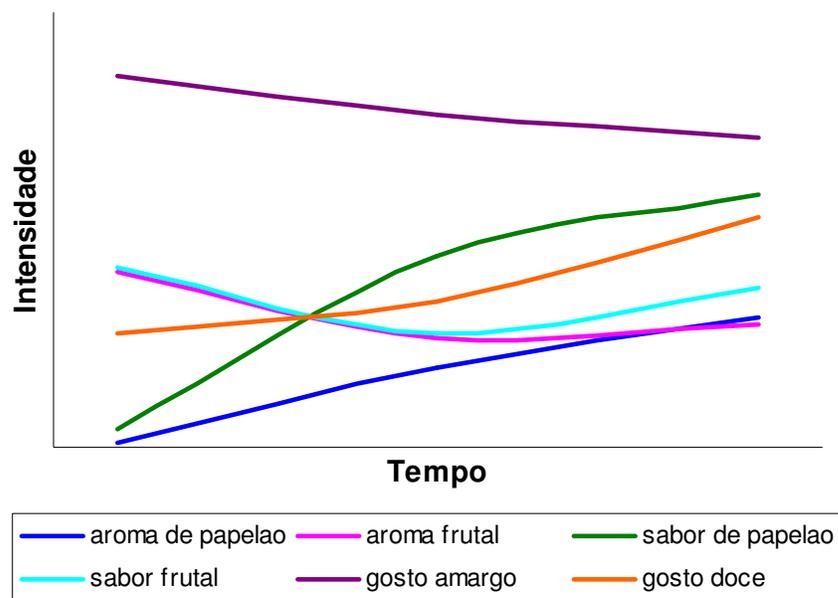


**Figura 5.6** Distribuição da freqüência das notas correspondentes à escala utilizada para avaliação da intenção de compra das amostras A, B e C durante envelhecimento forçado. As letras na codificação das amostras representam as amostras A, B e C. Os números representam o tempo da análise, 1: 8 dias, 2: 32 dias, 3: 65 dias, 4: 90 dias e 5: 120 dias.

## 5.4 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

O sabor característico de papelão é o maior indicador do processo oxidativo em cervejas, e seu aumento durante o envelhecimento do produto é proveniente de aldeídos insaturados. Dentre esses compostos, o *trans*-2-nonenal é o que apresenta maior atividade em quantidades acima do limiar de detecção. O aumento na percepção do sabor de papelão pela equipe de provadores nos últimos dias do período de envelhecimento confirma o processo de oxidação nas amostras estocadas durante 4 meses.

A formação de produtos da reação de Maillard durante a estocagem também foi evidenciada pelo aumento do gosto doce observado no final do envelhecimento.



**Figura 5.7** Perfil dos descritores sensoriais durante o período de envelhecimento da cerveja.

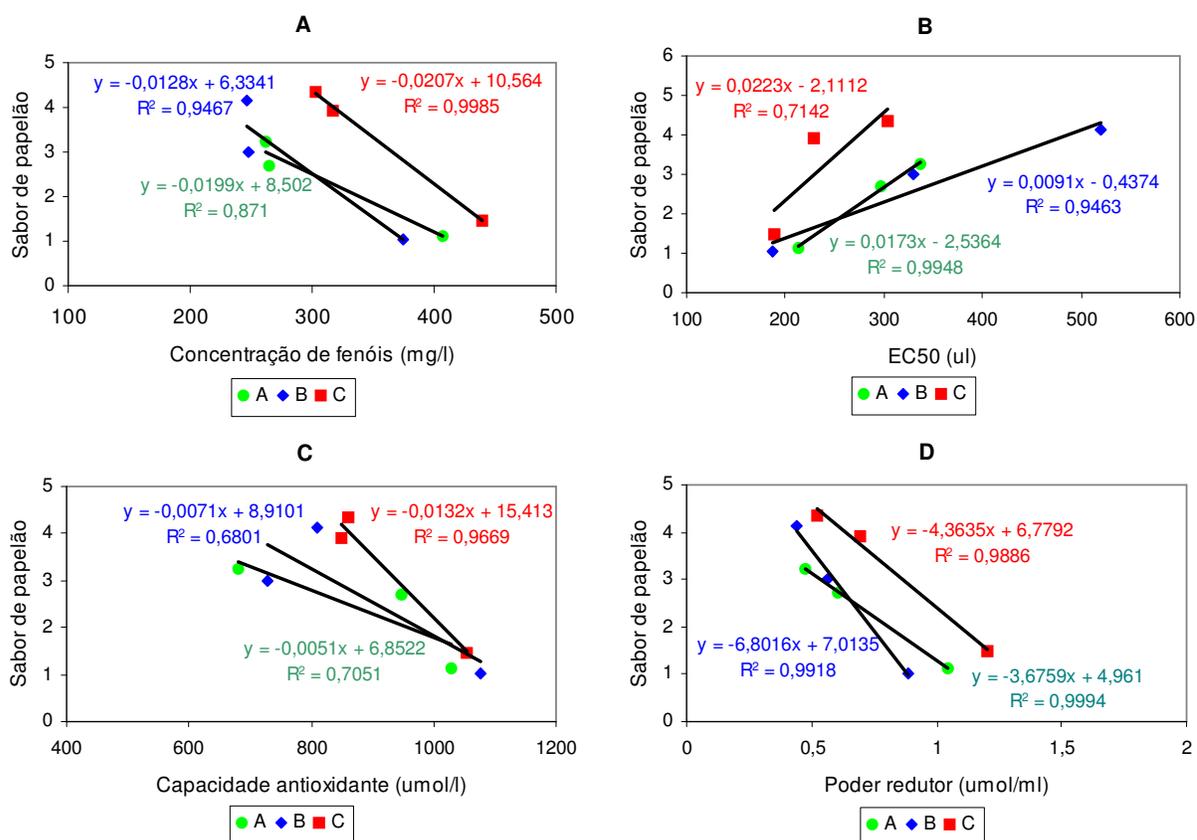
Os resultados obtidos através da análise descritiva quantitativa nos permitiram plotar a evolução da intensidade dos aromas e sabores percebidos ao longo do envelhecimento. A Figura 5.7 mostra o perfil dos descritores sensoriais utilizados neste estudo ao longo do tempo, descrevendo visualmente as principais alterações no sabor e aroma percebidas durante os 4 meses de análise.

As alterações sensoriais percebidas pela equipe de provadores não influenciaram na preferência dos consumidores, já que não foram percebidas diferenças na aceitação do produto em relação ao tempo de envelhecimento.

A comparação entre os resultados dos testes bioquímicos e sensoriais nos permitiu verificar a correlação entre as reações oxidativas e não-oxidativas que ocorrem durante o envelhecimento da cerveja e como elas afetam o perfil da capacidade antioxidante e as alterações sensoriais do produto. A degradação dos compostos fenólicos e diminuição da capacidade antioxidante da cerveja podem ser provenientes tanto de reações com espécies reativas de oxigênio e radicais

livres quanto de polimerizações, induzidas pela formação de acetaldeído. As alterações nas características sensoriais observadas, como o aumento do sabor de papelão e gosto doce, e diminuição do sabor e aroma frutal, são provenientes de reações não oxidativas, como esterificações, reação de Maillard e hidrólise de ésteres (Vanderhaegen *et al.*, 2006). Neste estudo foi observado que no final do período de envelhecimento há o aparecimento dos indicadores característicos das transformações oxidativas e não-oxidativas da cerveja.

A Figura 5.8 mostra que há correlação linear entre a diminuição da concentração dos compostos fenólicos e da habilidade antioxidante (DPPH, ABTS.+ e poder redutor) com o aumento do sabor característico de papelão, que é o maior indicador sensorial do processo de envelhecimento da cerveja.



**Figura 5.8** Correlação entre sabor de papelão e propriedade bioquímicas das amostras de cerveja A, B e C. (A) sabor de papelão x concentração de fenóis totais, (B) sabor de papelão x EC50, (C) sabor de papelão x capacidade antioxidante e (D) sabor de papelão x poder redutor.



## **CAPÍTULO 6. CONCLUSÕES FINAIS**

Este estudo indica que a cerveja, desde que consumida de forma moderada e constante, pode ser considerada uma importante fonte de compostos fenólicos com capacidade de atuar como antioxidantes.

Foi possível observar alterações bioquímicas e sensoriais na cerveja durante seu envelhecimento natural. Durante 4 meses de estocagem a cerveja pode perder até 50% de sua capacidade antioxidante, e desenvolver alterações sensoriais características do processo oxidativo.

A concentração de compostos fenólicos totais diminui cerca de 40% nas duas primeiras semanas de estocagem e se mantém constante após este período. Apesar do perfil da concentração de fenóis totais não apresentar alterações após 15 dias de envelhecimento há diminuição da capacidade antioxidante da cerveja durante o tempo de estocagem, provavelmente devido a alterações na

composição dos compostos fenólicos, que podem se polimerizar durante o envelhecimento. Os pontos críticos nos quais se observa queda na capacidade antioxidante são próximos aos 15, 35 e 100 dias de envelhecimento.

O trabalho mostrou que diferentes produtos com diferentes processos de estabilização sofrem a mesma diminuição da capacidade antioxidante da cerveja, indicando que este parâmetro pode estar relacionado ao tipo de matéria-prima (lúpulo, malte e levedura) utilizado e não ao processo de estabilização do produto.

O envelhecimento forçado (6dias/42°C) não apresentou transformações semelhantes às observadas durante o envelhecimento natural. O envelhecimento forçado pode ser capaz de produzir alterações nas propriedades sensoriais da cerveja, mas não apresenta alterações na concentração de compostos fenólicos totais e capacidade anti e pró-oxidantes.

Os testes sensoriais mostraram que há correlação entre as transformações químicas que ocorrem na cerveja, como o aumento na concentração de aldeídos, principalmente do *trans*-2-nonenal, responsável pelo aparecimento do aroma e sabor de papelão; e redução na concentração de ésteres, verificada neste estudo através do uso do acetato de isoamila nos testes sensoriais. Foi observado aumento do sabor de papelão ao final de 120 dias de envelhecimento, tendência à queda da percepção de aroma e sabor frutal, redução do gosto amargo e aumento da percepção do gosto doce, devido à formação de produtos da reação de Maillard. No entanto, essas alterações não mostraram ter influência na aceitação dos consumidores, uma vez que as amostras analisadas no final do envelhecimento apresentaram maior aceitação.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ALMEIDA e SILVA, J.B. **Tecnologia de Bebidas: matéria prima, processamento, BPF / APPCC, legislação e mercado/** Waldemar Gastoni Venturini Filho, coordenador – São Paulo: Edgard Blucher, 2005.

ANDERSEN, L. M.; OUTTRUP, H.; SKIBSTED, L. H. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. **J. Agric. Food. Chem.**, v.48, p.3106-3111, 2000

AQUARONE, E.; ALMEIDA LIMA, U.; BORZANI, W. **Alimentos e bebidas produzidos por fermentação.** São Paulo: Edgard Blücher, 1983.

ARAÚJO, F. B.; SILVA, P. H. A.; MINIM, V. P. R. Perfil sensorial e composição físico química de cervejas provenientes de dois segmentos do mercado brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos.** v.23, n.2, p. 121-128, 2003.

BAMFORTH, C. W. Beer: An Ancient Yet Modern Biotechnology. **Chem. Educator**, v. 5, p. 102–112, 2000.

BARKER, R. L.; GRACEY, D. E. F.; IRWIN, A. J.; PIRASTS, P. AND LEISKA, E. Liberation of staling aldehydes during storage of beer. **J. Inst. Brewing**, v. 89, p. 411-415, 1983.

BEER, D. DE; HARBERTSON, J. F.; KILMARTIN, P. A.; ROGINSKY, V.; BARSUKOVA, T.; ADAMS, D. O.; WATERHOUSE, A. L. Phenolics: a comparison of diverse analytical methods. **Am. J. Enol. Vitic.**, v.55, n.4, p.389-400, 2004.

BIENDL, M. Research on the xanthohumol content in hops. **Hopfen Rundschau International**, p. 72-75, 2002.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p. 1199-1200, 1958.

BRASIL. Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 de setembro de 1997.

BRASIL. Decreto nº 73267, 6 de dezembro de 1973. Dispõe sobre a definição e a classificação da cerveja quanto a especificações de tipo de fabricação, cor e teor alcoólico, padrões de qualidade, padrões de rotulagem e análises de controle. **Diário Oficial da União**, Brasília, setembro de 1973.

BRIGGS, D. E. **Malts and Malting**, London, Blackie Academic and Professional/Gaithersburg, Aspen Publishing, 796 pp., 1998.

CERVESIA - Disponível em: [http://www.cervesia.com.br/historia\\_da\\_cerveja.asp](http://www.cervesia.com.br/historia_da_cerveja.asp). Acesso em: março de 2006.

DALGLIESH, C. E. Flavour stability. **Proceedings of the European Brewery Convention Congress**, p. 623-659, 1977.

DAMÁSIO, M.H.; COSTELL, E. Análisis sensorial descriptivo: generación de descriptores y selección de catadores. *Rev. Agroquím. Tecnol. Alim.*,v.3(1/2), p.165-178, 1991.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v.55:11, p. 396-407, 1997.

DENK, V., FELGENTRAEGER, H. G. W., FLAD, W., LENEOL, M., MICHEL, R., MIEDANER, H., STIPPLER, K., HENSEL, H., NARZISS, L. and O'ROURKE, T. **European Brewery Convention: Manual of Good Practice, Wort Boiling and Clarification**, p. 176. Fachverlag Hans Carl, Nurenberg, 2000.

DROST, B. W.; BERG, R. VAN DEN, FREIJEE, F. J. M.; VELDE, E. G. VAN DER; HOLLEMANS, M. Flavor stability. **Proceedings of the 55th Annual Meeting**, Denver, CO, p. 124-1331, 1989.

FANTOZZI, P.; MONTANARI, L.; MANCINI, F.; GASBARRINI, A.; DDOLORATO, G.; SIMONCINI, M.; NARDINI, M.; GHISELLI, A.; SCACCINI, C. *In vitro* antioxidant capacity from wort to beer. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v.31, p.221–227, 1998.

FREITAS, G. L. Potencial antioxidante e compostos fenólicos na cerveja, chopp, cevada (*Hordeum vulgare* L.) e no bagaço de brassagem. **Dissertação de Mestrado** - Curso de Pós-graduação em Ciência dos alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis -SC. 2006. 86p.

FRÉMONT, L. Biological effects of resveratrol. **Life Sciences**. v. 66, n.08, p. 663-673, 2000.

GALATO, D.; GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; SPINELLI, A. Caracterização da atividade antioxidante de compostos fenólicos através de métodos eletroanalíticos.

**Livro de resumos, 10º ENQA – Encontro de Química Analítica**, Santa Maria, 1999.

GARCÍA, A. A., GRANDE, B. C., GÁNDARA, J. S. Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.175-180, 2004.

GASOWSKI, B., LEONTOWICZ, M., LEONTOWICZ, H., KATRICH, E., LOJEK, A., CIZ, M., TRAKHTENBERG, S., GORINSTEIN, S. The influence of beer with different antioxidant potential on plasma lipids, plasma antioxidant capacity, and bile excretion of rats fed cholesterol-containing and cholesterol-free diets. **Journal of Nutritional Biochemistry** v.15, p.527-533, 2004.

GERHAUSER, C.; ALT, A. P.; KLIMO, K.; KNAUFT, J.; FRANK, N.; BECKER, H. Isolation and potential cancer chemopreventive activities of phenolic compounds of beer. **Phytochemistry Reviews**, v.1 p.369-377, 2002.

GERHAUSER, C. Beer constituents as potential chemopreventive agents. **European Journal of Cancer** v. 41, p. 1941-1954, 2005.

GHISELLI, A., NATELLA, F., GUIDI, A., MONTANARI, L., FANTOZZI, P., SCACCINI, C. Beer increases plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Nutrition and Biochemistry**, v.11, p.76-80, 2000.

GIJS, L., CHEVANCE, F., JERKOVIC, V., & COLLIN, S. How low pH can intensify beta-damascenone and dimethyl trisulfide production through beer aging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5612–5616, 2002.

GORINSTEIN, S., CASPI, A., ZEMSER, M., TRAKHTENBERG, S. Comparative contents of some phenolics in beer, red and white wines. **Nutrition Research**, v.20 n.1, 131-139, 2000.

HALLIWELL, B. Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo. In: **Handbook of antioxidants**, 2. ed., Marcel Decker, USA: Enrique Cadenas e Lester Packer, p. 1-33, 2002.

JACOB, R.; BURRY, B. Oxidative damage and defense. **American Journal of Nutrition**, v. 63, p.985 – 989, 1996.

JAMIESON, A. M. & VAN GHELUWE, J. E. A. Identification of a compound responsible for cardboard flavour in beer. **Proceedings of the American Society of Brewing Chemists**, p. 92-93, (1970).

KANEDA, H.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S.; MUNEKATA, M.; KOSHINO, S. Contribution of carbonyl-bisulfite adducts to beer stability. **J. Agric. Food Chem.**, v.42, p.2428-2432, 1994.

KELLING, S.T.; HALPERN, B.P. Taste flashes: reaction times, intensity and quality. **Science** p. 219-412, 1983.

KETELSEN, S.M.; KEAY, C.L.; WIET, S.G. Time-intensity parameters of selected carbohydrate and high potency sweeteners. **Journal of Food Science**, v. 58, p. 1418-1421, 1993.

KEUKELEIRE, D. DE. Fundamentals of beer and hop chemistry. **Química Nova**, v.23, n.1, p. 108-112, 2000.

KUNZE, W. **Technology brewing and malting**. Berlim: VLB, 1997.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M. T.; FETT, R. Wild fruits and pulps of frozen fruits: antioxidant activity, polyphenols and anthocyanins, **Ciência Rural**, v. 26 n.4, p 1283-1287, 2006.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A.G.; TRONCOSO, A. M.; MANCINI, J.; FETT, R. Aplicação de diversos métodos químicos para determinar atividade antioxidante em polpa de frutas. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v. 25:4, p. 726-732, 2005.

LERMUSIEAU, G.; NOEL, S.; LIEGEOIS, C.; & COLLIN, S. Nonoxidative mechanism for development of trans-2-nonenal in beer. **Journal of American Society of Brewing Chemists**, v. 57, p. 29-33, 1999.

LERMUSIEAU, G., LIÉGEOIS, C., COLLIN, S. Reducing power of hop cultivars and beer ageing. **Food Chemistry**, v.72, p. 413-418, 2001.

LIEGEOIS, C.; MEURENS, N.; BADOT, C.; & COLLIN, S. Release of deuterated (E)-2-nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized before boiling. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7634-7638, 2002.

LUGASI, A. Polyphenol content and antioxidant properties of beer. **Acta Alimentaria**, v. 32:2, p. 181-192, 2003.

MacFIE H. J. H., THOMSON D. M. H., Preference Mapping and Multidimensional Scaling. In: PIGGOT J.R., ed. **Sensory Analysis of Foods**, 2nd ed., Elsevier, London, p. 389, 1988.

MacFIE, H.J.; BRATCHELL, N.; GREENHOFF, K.; VALLIS, L.V. Designs to balance the effect of order of presentation and first-order carry-over effects in hall. **Journal of Sensory Studies**, v.4 p.129-148, 1989.

MAILLARD, M. N., SOUM, M. H., BOIVIN, P., BERSET, C., Antioxidant activity of barley and malt: relationship with phenolic content. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.29, p.238-244, 1996.

MAMEDE, M. E. De O.; PASTORE, G. M. Compostos fenólicos do vinho: estrutura e ação antioxidante. **B. CEPPA**, v. 22 n.222, p. 223-252, 2004.

MONTANARI, L., PERRETTI, G., NATELLA, F., GUIDI, A., FANTOZZI, P. Organic and phenolic acids in beer. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v.32, p.538-539, 1999.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., & KELLY, R. J. Evaluation of rapid colloidal stabilization with polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, p. 38–43, 1997.

MCMURROUGH, I., MADIGAN, D., KELLY, R. J., & SMYTH, M. R. The role of flavanoid polyphenols in beer stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, p. 141–148, 1996.

MINUSSI R. C.; ROSSI M.; BOLOGNA L.; CORDI L.; ROTILIO D.; PASTORE G.M.; DURAN N. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. **Food Chemistry**, v. 82, n.3, p. 409-416, 2003.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v.26, n.2, p. 211-219, 2004.

OÑATE-JAÉN, A.; BELLIDO-MILLA, D.; HERNÁNDEZ-ARTIGA, M. P. Spectrophotometric methods to differentiate beers and evaluate beer ageing. **Food Chemistry**, v.97, p.361-369, 2006.

Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. **American Society for Nutritional Sciences**. v.133, n.9, p. 2812-2819, 2003.

PESSA, E. European Brewing Convention, **Proceedings of the 13<sup>th</sup> Congress**, Estoril, p. 333, 1971.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26 p. 1231-1237, 1999.

RUFÍAN-HENARES, J. A.; DELGADO-ANDRADE, C.; MORALES, F. J. Assessing the antioxidant and pro-oxidant activity of phenolic compounds by means of their copper reducing activity. **Eur. Food Research Technology**, v.223, p.225-231, 2006.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**. V.130, p.2073S-2085S, 2000.

SINDICERV, **Sindicato Nacional das Indústrias de Cerveja**, Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br/mercado.php>. Acesso em: 2006.

SINGLETON, V. L. e ROSSI, J. A. Jr. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic.** v.16 n.3, p.144-158, 1965.

STEWART, G. G. A brewer's delight. **Chemistry and Industry**, p. 706-709, nov.,2000.

STEWART, G. G. The chemistry of beer instability. **Journal of Chemical Education**, v. 81, n. 7, julho, 2004.

STEVENS, J.F., TAYLOR, A. W., CLAWSON, J. E. AND KINZER, M. L. Fate of xanthohumol and related prenylflavonoids from hops to beer. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 2421-2428, 1999.

STEVENS, J.F.; PAGE, J. E. Xanthohumol and related prenylflavonoids from hops and beer: to your good health! **Phytochemistry**, v.65, p.1317-1330, 2004.

STONE, I. & LASHIVER, C. **Proceedings of the American Society of Brewing Chemists**, p. 46, 1957.

STONE, H., SIDEL, J.L., OLIVE, S., WOOLSEY, A.; SINGLETON, R.C. Sensory evaluation by quantitative descriptive analysis. **Food Technology**, v.28, n.1, p.24 - 34, 1974.

STONE,H., SIDEL,J.L., **Sensory evaluation practices**. New York: Academic Press, 2ed., p. 338, 1993.

SYRYN, E.; MALFLIET, S.; GOIRIS, K.; OPSTAELE, F. V.; ROUCK, G. De; COOMAN, L. De ; AERTS, G. An Integrated Analytical – Sensorial Methodology for Adequate Evaluation of the Flavour Stability of Pilsner Beer. In: **Proceedings of the 31<sup>st</sup> European Brewing Convention**. Venice, Italy, 2007.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; COGHE, S.; VERSTREPEN, K. J.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. Evolution of chemical and sensory properties during aging of top-fermented beer. **J. agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.6782-6790, 2003.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry** v. 95, p. 357-381, 2006.

WALTERS, M. T., HEASMAN, A. P. AND HUGUES, P. S., Comparison of (+)-catequin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavour stability. Part I: forced-aging. **J. Am. Soc. Brew. Chem.**, v.55 n.2, p.43 -89, 1997.