UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA – UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JÉSSICA PALHARES RIBEIRO

Avaliação da composição de fenólicos totais, açúcares e proteínas em cervejas artesanais produzidas em Jequié-BA

JEQUIÉ – BA
SETEMBRO / 2019

JÉSSICA PALHARES RIBEIRO

Avaliação da composição de fenólicos totais, açúcares e proteínas em cervejas artesanais produzidas em Jequié-BA

Dissertação (em formato de artigo) apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

JEQUIÉ – BA

SETEMBRO / 2019

TERMO DE APROVAÇÃO

Jéssica Palhares Ribeiro

Avaliação da composição de fenólicos totais, açúcares e proteínas em cervejas artesanais produzidas em Jequié – BA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes
(UFBA, Salvador – BA, 2011)

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira
(UFBA, Salvador – BA, 2014)

Profa. Dra. Rosane Moura Aguiar
(UFBA, Salvador – BA, 2008)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 26 / 09 / 2019

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

Agradeço à minha família, pelo incentivo e apoio em todos os momentos, em especial à minha mãe e meu companheiro Eric.

Agradeço ao Professor Dr. Cleber Galvão Novaes pela paciência e compreensão durante as orientações deste trabalho.

Agradeço aos colegas de laboratório de Química Analítica III, Berlane, Ivana, Franciele, Joselânio pelas horas de descontração e companhia, e a todos os colegas do grupo de pesquisa LQA aqui não citados.

Agradeço aos meus amigos próximos, Daniel, Perla, Roberta e Vanessa, pelas resenhas e auxílios nos momentos certos.

Ao laboratório de Química Analítica (LQA) da UESB, sob a coordenação do Professor Dr. Valfredo Azevedo Lemos.

Ao laboratório de farmacotécnica da UESB, ao Prof. Dr. Baraquizio Braga e ao mestrando Romário Santana que auxiliou durante todos os processos de análise.

Agradeço especialmente a Rubens, Andréia, Moacy e Rosane, por concederem os espaços residenciais e apoio nas coletas e brassagens, e também por compartilharem seus conhecimentos sobre cervejas artesanais.

Agradeço ao programa de Pós-Graduação em Química da UESB (PGQUI) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado, Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1:	Evolução no Registro de Cervejarias no Brasil.....	01
Figura 2:	Distribuição das cervejarias por unidade da federação.....	02
Figura 3:	Processo de produção da cerveja.....	04
Figura 4:	Coloração apresentada dos compostos fenólicos na presença do reagente de Folin-Ciocalteu.....	14
Figura 5:	Reação do ácido gálico na presença do reagente de Folin-Ciocalteu.....	15
Figura 6:	Curva padrão de ácido gálico.....	15
Figura 7:	Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo APA.....	16
Figura 8:	Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream.....	16
Figura 9:	Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo Red.....	16
Figura 10:	Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss.....	17
Figura 11:	Forma estrutural do ácido ferúlico.....	18
Figura 12:	a) Estrutura química do BG-250 e b) espécies absorventes do corante.....	19
Figura 13:	Coloração obtida durante a reação entre proteínas e o reagente BG-250.....	19
Figura 14	Curva padrão de Abulmina.....	20
Figura 15:	Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA.....	20
Figura 16:	Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream.....	21
Figura 17:	Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red.....	21
Figura 18:	Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss.....	21
Figura 19:	Curva padrão de glicose.....	23
Figura 20:	Reação de redução do DNS.....	24
Figura 21:	Reação obtida na determinação de açúcar redutor usando DNS.....	24
Figura 22:	Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA.....	24
Figura 23:	Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream.....	25
Figura 24:	Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red.....	25
Figura 25:	Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss.....	25
Figura 26:	Curva padrão de glicose.....	27
Figura 27:	Coloração obtida na reação para determinação de açúcar total.....	27
Figura 28:	Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA.....	28
Figura 29:	Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream.....	28

Figura 30: Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red..... 28
Figura 31: Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss..... 29
Figura 32: Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA..... 30
Figura 33: Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream..... 30
Figura 34: Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red..... 31
Figura 35: Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss..... 31
Figura 36: Comportamento dos componentes no malte base..... 32
Figura 37: Comportamento dos componentes no mosto..... 32
Figura 38: Comportamento dos componentes no bagaço do mosto..... 33
Figura 39: Comportamento dos componentes no produto final..... 33

LISTA DE TABELA

Pág.

Tabela 1: Processo de coleta das amostras..... 11

Tabela 2: Informações do processo de produção para os diferentes tipos de cerveja..... 13

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABV	Álcool por volume, *do inglês Alcohol by Volume*
APA	*do inglês American Pale Ale*
BG-250	*do inglês Coomassie Brilliante Blue*
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
FAAS	Espectrometria de Absorção Atômica com Chama, *do inglês Flame Atomic Absorption Spectrometry*
FAES	Espectrometria de Emissão Atômica com Chama, *do inglês Flame Atomic Emission Spectrometry*
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, *do inglês High Performance Liquid Chromatography*
LTP1	Proteínas de Transferência de Lipídios, *do inglês Lipid Transfer Proteins*
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MIP OES	Espectrometria de Emissão Óptica com Plasma Induzido por Micro-Ondas, *do inglês Microwave Induced Plasma Optical Emission Spectrometry*
PIB	Produto Interno Bruto
UV-Vis	Ultravioleta/Visível

Avaliação da composição de fenólicos totais, açúcares e proteínas em cervejas artesanais produzidas em Jequié-BA

Autora: Jéssica Palhares Ribeiro
Orientador: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

RESUMO

É notável o crescimento das micro cervejarias no Brasil, já que estas são caracterizadas pela elaboração de uma cerveja mais encorpada, com aroma e sabor mais pronunciados, valorizando os métodos tradicionais de produção. Assim, surgiu a necessidade e oportunidade de estudar os teores de fenólicos totais, proteínas e açúcares (totais, redutores e não redutores) presentes em cervejas do tipo Ale (APA, Cream, Red e Weiss) produzidas em sistema artesanal na cidade de Jequié, Bahia, Brasil. A metodologia foi aplicada com base no método Folin-Ciocalteu para quantificar fenólicos (740 nm), Bradford para proteínas (595 nm) e os reagentes DNS/fenol/ácido sulfúrico para açúcares (540 e 480 nm). Todas as análises foram realizadas usando espectrofotômetro UV-Vis, em diferentes etapas do processo: água, malte, mosto, sólido do mosto, lúpulo, levedura, produto fermentado e produto final (n=3). A maior concentração de fenólicos totais no produto final foi obtida na cerveja do tipo Cream (≈ 3700 µg/g) e a que apresentou a menor concentração foi a do tipo APA (≈ 2100 µg/g). Para o teor de proteínas, a cerveja que apresentou as maiores concentrações foram a do tipo Weiss (≈ 80 g/L), e as menores foram a do tipo Cream (≈ 35 g/L). Para os açúcares, a cerveja do tipo Cream apresentou os maiores teores. As demais cervejas apresentaram concentrações de açúcares próximas entre si. Os resultados obtidos neste estudo estão concordantes com os apresentados em outros trabalhos relatados na literatura. Foi possível observar que, mesmo a cerveja passando por diferentes etapas durante o processo de fabricação, parte considerável dos nutrientes estudados permanecem no produto final.

Palavras-chave: Fenólicos totais, Proteínas, Açúcares, Cerveja artesanal, Espectrofotometria.

Evaluation of the composition of total phenolics, sugars and proteins in craft beers produced in Jequié-BA

Author: Jéssica Palhares Ribeiro
Advisor: Prof. Dr. Cleber Galvão Novaes

ABSTRACT

The growth of microbreweries in Brazil is remarkable, as they are characterized by the elaboration of a fuller beer, with more pronounced aroma and flavor, cherishing traditional methods of production. Thus, the need and opportunity arose to study the levels of total phenolics, proteins and sugars (total, reducing and non-reducing) present in Ale beers (APA, Cream, Red and Weiss) produced in artisanal mode in Jequié city, Bahia state, Brazil. The methodology was applied based on the Folin-Ciocalteu method to quantify phenolics (740 nm), Bradford for proteins (595 nm) and DNS/phenol/sulfuric acid reagents for sugars (540 and 480 nm). All analyzes were performed using UV-Vis spectrophotometer for different process steps: water, malt, must, must solid, hops, yeast, fermented product and final product (n=3). The highest concentration of total phenolics in the final product was obtained in Cream beer (≈ 370 µg/g) and the lowest was obtained in APA beer (≈ 2100 µg/g). For the protein content, the Weiss beer presented the highest concentrations (≈ 80 g/L) while Cream beer presented the lowest (≈ 35 g/L). For sugars, Cream beer presented the highest levels. The other beers presented sugar concentrations close to each other. The results obtained in this study are in agreement with those presented in other studies reported in the literature. It was observed that, even going through different stages during the brewing process, a significant part of the studied nutrients remain in the final product.

Keywords: Total phenolics, Proteins, Sugars, Craft beer, Spectrophotometry.

SUMÁRIO

Pág.

1. Introdução..... 01

2. Procedimento Experimental..... 09

2.1 Coleta das amostras..... 09

2.2 Determinação de Componentes..... 10

2.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais..... 10

2.2.2 Determinação de Proteína Total..... 10

2.2.3 Determinação de açúcares..... 11

2.3 Informações do processo de produção artesanal da cerveja..... 12

3. Resultados e Discussão..... 14

3.1 Determinação de Compostos fenólicos totais..... 14

3.2 Determinação de Proteína Total..... 19

3.3 Determinação de açúcares..... 23

3.4. Avaliação dos resultados durante as etapas de fabricação..... 32

4. Conclusão..... 35

5. Perspectivas..... 36

6. Referências Bibliográficas..... 37

Apresentação

Este trabalho de Dissertação de Mestrado foi desenvolvido no Laboratório de Química Analítica III da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Campus de Jequié. As análises utilizando o espectrofotômetro UV-Vis, assim como os reagentes, foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Farmacotécnica e Farmacodinâmica da UESB, com o apoio do Prof. Dr. Baraquizio Braga do Nascimento Júnior e do mestrando Romário Alves Santana.

Este manuscrito foi escrito seguindo o formato de ***Publicação***, conforme as orientações constantes no ***Manual para Elaboração de Dissertações*** do Programa de Pós-Graduação em Química (PGQUI-UESB). A escrita da dissertação seguiu as instruções do periódico ***Química Nova***, para submissão após as alterações sugeridas pela banca examinadora.

1. INTRODUÇÃO

A cerveja, do latim *cervisia*, é definida como sendo a bebida obtida do produto da fermentação alcoólica, por ação de levedura, de mosto de cereais maltados, preparados com cevada, acrescido ou não com adjuntos (outros cereais, fontes de açúcares ou ricos em amido, como arroz, milho ou trigo), aromatizada pela adição do lúpulo, ao qual o seu teor alcóolico varia entre 3 e 8% (v/v). [1,2,3]

Por muitos séculos, a produção de cerveja em escala artesanal era suficiente para suprir toda a demanda, no entanto, houve uma grande difusão e aceitação desta bebida ao longo de sua história, o que levou a cerveja a ser uma das bebidas mais apreciadas e consumidas pelo mundo.[3] No Brasil, a cerveja foi introduzida pela Inglaterra, após a abertura dos portos às nações amigas de Portugal[1], e atualmente o país está estre os maiores produtores mundiais, ao qual a sua atuação no mercado movimenta uma extensa rede que é responsável por 1,6% do PIB e 14% da indústria de transformação nacional.[1]

Na Figura 1, observa-se a evolução do registro de cervejarias no Brasil, de acordo com dados retirados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2018. Hoje, 479 municípios brasileiros possuem cervejarias, aproximadamente 10% das cidades existentes no país, sem levar em consideração as clandestinas.[4] A Figura 2 apresenta a distribuição das cervejarias por unidade da federação.[5]

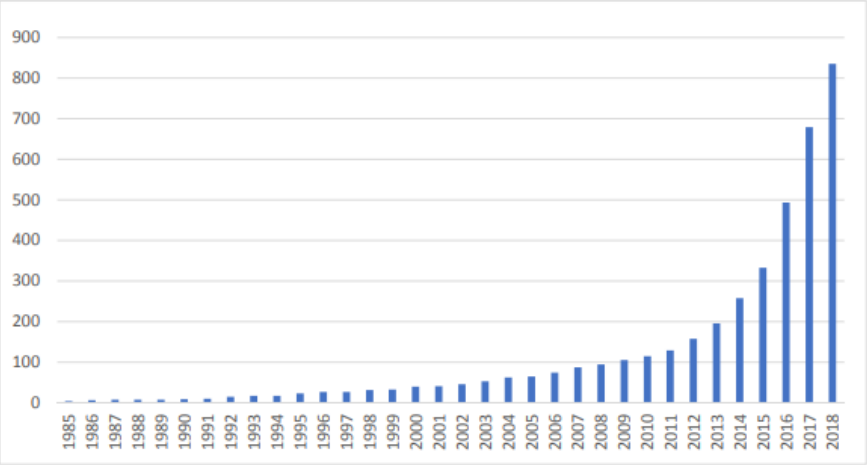

Figura 1: *Evolução no Registro de Cervejarias no Brasil. Fonte: Anuário Da Cerveja no Brasil 2018 (adaptada).*

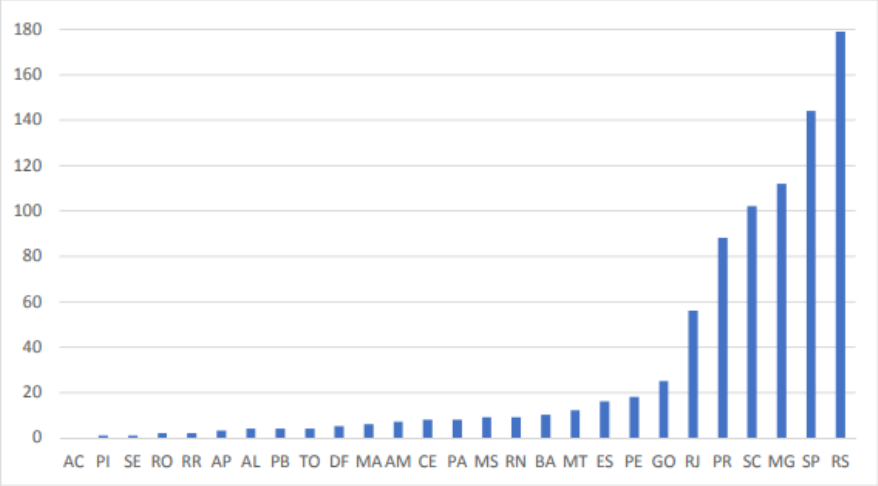

Figura 2: *Distribuição das cervejarias por unidade da federação. Fonte: www.agricultura.gov.br.*

A classificação da cerveja pode ser feita de acordo com seu processo fermentativo, sendo: i) um grupo de alta fermentação e ii) outro de baixa fermentação. O primeiro se refere às cervejas tradicionais (Ale), em que o micro-organismo utilizado é o da espécie *Sacaromices cerevisae* e a fermentação ocorre em temperaturas próximas a 18 °C durante 4 ou 5 dias. As cervejas de baixa fermentação utilizam a espécie *Sacaromices uvarum* a uma temperatura próxima a 12 °C durante 8 ou 9 dias, referindo-se ao tipo Lager. Esse tipo de classificação gera as cervejas mais conhecidas, como: Altbier, Barley Wine, Belgian Ale, Bitter, Brown, Ale, Pale Ale, Porter, Stout, Scottish, Abadia, Bock Doppelbock, Münchener e Pilsen.[1]

O que difere as cervejas do tipo Ale é o tipo de fermentação à qual são submetidas, que é feita em temperatura mais alta, é um dos processos mais antigos, o que fez com que as cervejas desse tipo fossem as únicas disponíveis até meados do século XIX. Devido ao processo de alta fermentação, os sabores mais complexos, frutados e lupulados da cerveja são realçados, já que são consideradas cervejas mais encorpadas e vigorosas. Mesmo assim, as características podem variar dentro da categoria da seguinte forma:

- *American Pale Ale (APA)* – Sua coloração vai desde o amarelo dourado até a cor de cobre, com o estilo definido pelo lúpulo de origem americana que transmite um forte aroma assim como uma relativa acidez, sabor suave do malte, agradável secura e ligeiramente frutada.[6]

- *Cream Ale* - Possui aspecto claro e límpido, de corpo leve, forte presença de gás e com pouca ou nenhuma sensação de lúpulo quer no aroma, quer no sabor, o que faz com que tenham uma acidez média a reduzida. Por vezes pode-se saborear milho, que é misturado pelas cervejeiras em detrimento do uso de malte ou lúpulo.[7]
- *Red Ale* – Costuma ser suave, equilibrada e leve. Com um início adocicado, segue-se o sabor típico do malte e um fim com cereais torrados, o que lhe dá um caráter seco. Estas características podem ser acentuadas e, em consequência, adulteradas se a cerveja for servida muito fria. A sua cor avermelhada é obtida através da junção de malte de cevada, sendo que por vezes se utiliza milho, arroz ou mesmo açúcar para suavizar o produto final. A presença de gás não é elevada, bem como a do álcool: entre 4% e 6% ABV (álcool por volume).[8]
- *Weissbier* – É feita à base de trigo, mas pode conter milho e mesmo frutas. É característica do sul da Alemanha (Baviera). Cervejas claras, bastante refrescantes e de graduação alcoólica na faixa de 5-6%, são opacas porque normalmente não são filtradas após a fermentação e a maturação. Produzem, em geral, uma espuma densa e persistente.[9]

O cervejeiro deve analisar com atenção a matéria-prima (composição química da água, tipo de malte, proporção malte/adjunto, variedade, quantidade, forma e pontos de adição de lúpulo); assiduidade da higienização dos equipamentos e os parâmetros fermentativos, para assim obter uma cerveja de boa qualidade.[1] Como pode-se observar na Figura 3[9], toda produção começa com a adição de água ao malte e adjuntos já moídos. Esta mistura é então cozida e, durante o processo, o amido do malte é convertido em açúcar. O resultado é um líquido turvo e grosso, denominado de mosto, que é filtrado e novamente fervido para que se possa adicionar o lúpulo, responsável pelo aroma e sabor amargo da cerveja. O mosto é então resfriado para o início do processo de fermentação, ao qual a glicose é processada e convertida em etanol e gás carbônico pela levedura sob condições anaeróbicas.[2]

Figura 3: *Processo de produção da cerveja. Fonte: Rosa & Afonso, 2015.*

Quanto à composição química, no geral, além do álcool etílico, a cerveja apresenta teor de proteína por volta de 0,5 a 1,3 g/100 mL (albumina, globulina, a prolamina e a glutelina), vitaminas do complexo B, carboidratos (glicose, maltose, dextrinas entre outros), dióxido de carbono, minerais (cálcio, fósforo, enxofre e outros) e água entre 90 à 95% e ainda uma mistura complexa de compostos fenólicos, variando entre 150-350 mg/L.[10] Devido à presença de alguns desses componentes, estudos indicam que a cerveja pode trazer benefícios à saúde humana quando ingerida de forma moderada,[3] e parte importante destes estudos é avaliar a viabilidade desses componentes, pois, embora estejam presentes no dia-a-dia, muitos possuem pouca ou baixa absorção no organismo.[11]

A presença de compostos fenólicos vem sendo relacionada com a capacidade antioxidante, e sugere-se fornecer ao organismo esse tipo de moléculas que podem ajudar no processo protetivo, pois o oxigênio está presente na atmosfera na forma triplete ($3O_2$), que é estável, e quando inalado, ocorre um processo gradual de redução produzindo água, porém uma pequena quantidade de produtos intermediários instáveis. Estas espécies, chamadas de espécies reativas de oxigênio, podem iniciar a peroxidação dos lipídeos da membrana. Os produtos, primários e secundários, da peroxidação são altamente reativos, e reagem com substratos biológicos como proteínas, aminas e moléculas de DNA. Tal processo leva a doenças degenerativas. Embora os organismos vivos possuam mecanismos protetores contra as espécies reativas de oxigênio a eficiência destes processos decresce de acordo com o envelhecimento do organismo.[10]

O consumo de substâncias antioxidantes naturais na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos e entre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipo-oxigenase.[12] Em alimentos, os fenóis são responsáveis pela cor, adstringência, aroma e estabilidade oxidativa. Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais, possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais.[13]

Existe cerca de cinco mil fenóis,[12] dos quais, o ácido ferúlico é o predominante dos ácidos fenólicos na cerveja, correspondendo a 48-58%.[9] Já em grãos de cevada, têm sido identificados derivados dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico conhecidos por atuarem como antioxidantes primários na recepção de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia e encontram-se presentes na camada de aleurona e no endosperma do grão.[11]

A cerveja é uma bebida que possui capacidade antioxidante moderada, devido à presença de compostos fenólicos, associada a um relativo baixo teor alcoólico. Desta forma ela promove o aumento da capacidade antioxidante do plasma sem os efeitos negativos provocados pelo consumo de altas doses de etanol, sendo assim pode ser considerada uma boa fonte de polifenóis,[14] dos quais, por serem mais ácido são oxidados antes que outras moléculas funcionando como antioxidantes e protegendo a integridade do organismo,[10] conferindo a capacidade de prevenir algumas patologias, que envolvem a participação dos radicais livres dentre as quais citam-se: câncer, catarata, doenças cardiovasculares e outras doenças.[9]

Muitos estudos determinam compostos fenólicos totais em cervejas através da aplicação do método de Folin-Ciocalteu.[15,16] Neste método, o reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+. Na presença de espécies que atuam como agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, cuja a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e que sua coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica.[17]

A cerveja possui uma concentração significativa de proteínas presentes, que estão sendo relacionadas à uma das primeiras características utilizadas na avaliação de

uma cerveja, que é a qualidade da espuma, uma vez que ela possui a capacidade de influenciar na decisão de compra dos consumidores, sendo considerada muito importante para a indústria cervejeira, já que as mesmas contribuem para o melhor sabor da cerveja. Sendo assim, há uma grande preocupação em mantê-la estável. Uma característica importante da espuma é a aderência: ao ser colocada no copo, o ideal é que se formem cinco anéis.[18]

Em média a cerveja tem uma concentração protéica de aproximadante 500 mg/L. Enquanto que alguns dos polipeptídeos e proteínas, de massas moleculares compreendidas entre 10 e 40 kDa, não apresentam qualquer função na cerveja (exceto na contribuição nutricional e no "flavour") outras são responsáveis pela formação de turvação coloidal e ainda outras (cerca de 25%) intervêm no processo de estabilização da espuma.[19] As proteínas originárias da cevada são o principal constituinte da cerveja capaz de estabilizar a sua espuma. Seus níveis na cerveja são uma indicação da qualidade da espuma e dependem do tipo de cevada utilizado, da região e do país onde esta foi produzida.[14]

Alguns investigadores identificaram propriedades dos polipeptídeos e proteínas que têm impacto na formação e na estabilidade da espuma da cerveja, dentre eles destacam-se a proteína Z, LTP1(proteínas de transferência de lipídios), hordeínas e as puroindolinas. A proteína Z mantém-se praticamente inalterada ao longo do processo de produção da cerveja além de ser termoestável e resistente à proteólise, devido às suas propriedades inibidoras das proteases. A proteína LTP1 é relacionada como promotora da formação da espuma e contém cerca de oito resíduos de cisteína, que, provavelmente, estarão presentes como cistinas (forma oxidada) na cerveja e quatro resíduos de lisina, que são os potenciais locais de glicosilação. As hordeínas são proteínas (prolaminas) de armazenamento, existentes nos grãos de cevada, representando cerca de 40% da quantidade total de proteína encontrada no grão. Quando em estado nativo, as hordeínas apresentam uma capacidade de estabilização da espuma, que pode aumentar ligeiramente por tratamento térmico. As puroindolinas existentes na cerveja são proteínas provenientes do trigo e tem a capacidade de se ligarem aos lipídios. A adição destas proteínas à cerveja atenua o efeito negativo dos lipídios sobre a espuma da mesma, no entanto, informações acerca deste grupo de proteínas são reduzidas.[19]

Durante a mosturação são originados os açúcares fermentescíveis que serão utilizados como alimento pelas leveduras, produzindo o álcool da cerveja. Essas hexoses como a Maltose, glicose e frutose são açúcares redutores por possuírem grupo carbonílico e cetônico livres, capazes de se oxidarem na presença de agentes oxidantes em solução alcalinas.[20] Os dissacarídeos que tem ligações glicosídicas entre seus carbonos anoméricos e não podem se converter para sua forma aberta com o grupo aldeído e são denominados de açúcares não redutores.[21]

Ainda há poucos relatos na literatura à respeito da determinação do teor de açúcares redutores e não redutores solúveis nos resíduos cervejeiros, mas sabe-se que o teor de açúcares redutores presentes em bagaço de malte é de aproximadamente 2,4% (m/m de matéria seca) e a deposição do trub quente promove arraste de mosto e perdas entre 1 e 2% de extrato fermentescível.[2]

Silva e colaboradores elaboraram cervejas de alto e médio teor alcoólico, através de processo artesanal, verificando se o teor alcoólico e a quantidade de açúcares totais. Os autores encontraram que a cerveja de alto teor alcoólico apresentou maior concentração de açúcares. A determinação de açúcares totais foi realizada através do método de Fehling.[22] Em outro estudo, Kempka e colaboradores fizeram a avaliação de características físico-químicas de cervejas do tipo Ale e observaram que o uso do mel nas formulações das cervejas promoveu um maior valor de açúcares totais residuais e uma maior acidez nas bebidas. O mel é constituído basicamente por açúcares fermentescíveis (41% de frutose, 34% de glicose, 1,31% de sacarose), contribuindo assim de forma efetiva para a fermentação da cerveja, pois os açúcares do mel e os extraídos dos grãos do malte fornecem alimentos e nutrientes para a levedura e são os precursores para a formação do álcool. A adição de mel como adjunto cervejeiro levou a cervejas de teor alcoólico inferiores a cerveja controle (sem adição de mel), porém, com valor aceitável para cervejas artesanais.[23]

Em 2008, Pawel Pohl, em seu artigo de revisão, destacou a importância em saber a composição de metais em cervejas e suas etapas de produção, visando a garantia da qualidade, já que íons metálicos afetam a fermentação, maturação e armazenamento de cerveja e implicam ao sabor final e estabilidade coloidal do produto. [24]

Técnicas cromatográficas também têm sido utilizadas para caracterizar cervejas artesanais. Chen e colaboradores otimizaram um método utilizando cromatografia

líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar o conteúdo de maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose e maltoheptaose na cerveja e espuma de cerveja. Os maltooligossacáridos influenciaram positivamente a estabilidade da espuma de cerveja.[25] A cerveja Brown Poter apresentou maiores concentrações de compostos bioativos seguidos por American Pale Ale, Irish Red Ale e American Pilsner.[26]

A incorporação de alimentos na produção de cervejas tem sido uma alternativa comum nos últimos anos. Machado (2017) estudou a incorporação de cacau na produção de cervejas não pasteurizadas determinando qual etapa seria a mais adequada para essa incorporação. A adição de cacau na brasagem, na lupulagem, na fermentação e na maturação foi realizada e as bebidas foram avaliadas quanto às suas características físico-químicas (teor alcoólico, cor, amargor, extrato real e primitivo, compostos fenólicos, flavonóides e capacidade antioxidante). Os extratos com maior teor alcoólico foram os que obtiveram maior valor de compostos fenólicos e flavonóides, porém não diferenciaram significativamente dos demais tratamentos quanto à capacidade antioxidante.[27]

O conhecimento aprofundado acerca dos resíduos e matéria-prima inerentes ao processo cervejeiro é especialmente notório, visto que é um produto com grande escala de produção e consumo, e que necessita de estudos analíticos contínuos tanto do processo quanto do produto final. Sendo assim, este estudo tem por objetivo determinar e relacionar a concentração de fenólicos totais, proteína e açúcares presentes em diferentes etapas do processo de fabricação de quatro tipos de cervejas artesanais (APA, Cream, Red Ale, Weiss) produzidas na cidade de Jequié, Bahia.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 Coleta das amostras

As amostras foram coletas em 2017 na cidade e Jequié, na Bahia, através de brassagens realizadas por produtores artesanais e durante um curso ministrado no IFBA-Jequié, cujas cervejas do tipo Ale (APA, Weiss, Red e Cream) foram produzidas.

Durante cada processo de brassagem realizou-se a coleta do malte principal e seus respectivos adjuntos, após cozimento coletou-se o mosto e o sólido restante, assim como o lúpulo que seria utilizado. Após adição do lúpulo realizou-se uma nova coleta do mosto após a fervura. Coletou-se também a levedura utilizada e a cerveja após a fermentação. Algumas cervejas, como a APA, passam por um processo denominado Dry Hopping, onde se adiciona lúpulo para aromatização, sendo assim, coletou-se a cerveja após esse processo e por fim, realizou-se a coleta da cerveja maturada pronta para consumo.

A Tabela 1 simplifica o processo de coleta das amostras enumerando-as por ordem do processo de produção.

Tabela 1: *Processo de coleta das amostras*

Etapa	Amostras
1	Água
2	Malte
3	Mosto
4	Sólido do Mosto
5	Lúpulo
6	Mosto Após Fervura
7	Levedo
8	Cerveja após Fermentação
9	Cerveja após Dry Hopping
10	Cerveja Maturada

2.2 Determinação de Componentes

As amostras sólidas, como maltes, sólido do mosto, lúpulo e levedo, passaram por um pré-tratamento, no qual 1,000 g do sólido foi pesado e 10,00 mL de água foi adicionada para extração, sob agitação em shaker (SL223, SOLAB) por 28 minutos a 30 °C a 170 rpm. Após essa etapa de extração, a solução foi submetida aos processos de análise, seguindo as metodologias apresentadas a seguir.

2.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para a quantificação dos compostos fenólicos nas amostras foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu.[17] Soluções com concentrações de 50,00; 100,00; 150,00; 200,00; 250,00 e 300,00 µg/mL foram preparadas utilizando padrão de ácido gálico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). De cada solução-padrão foi retirada uma alíquota de 100,00 µL e adicionada à 100,00 µL do complexante Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1,60 mL de água e 200,00 µL de carbonato de sódio saturado (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). A solução foi homogeneizada em vórtex (AP 59, Phoenix) e guardada no escuro por 30 minutos. Em seguida, realizou-se a medida analítica a 740 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis (NI 2- Mater).

Posteriormente, 100,00 µL da amostra foram utilizados em triplicata, passando pelas mesmas condições descritas anteriormente para o padrão de ácido gálico.

2.2.2 Determinação de Proteína Total

Para a quantificação de proteína total nas amostras foi utilizado o método de Bradford.[28] A curva analítica de calibração foi realizada com concentrações de 5,00; 10,00; 20,00; 30,00; 40,00; 50,00; 60,00; 70,00; 80,00; 90,00; 100,00, 110,00 g/L de solução padrão de albumina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). 50,00 µL deste padrão foi adicionado à 2,50 mL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Em até uma hora após início da reação realizou-se a medida analítica a 595 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

Posteriormente, 50,00 µL da amostra foram utilizados em triplicata, passando pelas mesmas condições descritas anteriormente para o padrão de albumina.

2.2.3 Determinação de açúcares

Açúcar redutor

Preparou-se a curva analítica de calibração através das medidas de concentrações de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90 e 1,00 g/L de solução padrão de glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Adicionou-se 200,00 µL deste padrão à 200,00 µL do reagente ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). O tubo de ensaio foi levado a banho-maria por 10 minutos a 100 °C. Em seguida adicionou-se 2,00 mL de água destilada. Posteriormente, realizou a medida analítica a 540 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

Posteriormente, 200,00 µL da amostra foram utilizados em triplicata, passando pelas mesmas condições descritas anteriormente para o padrão de glicose.

Açúcar total

Preparou-se a curva analítica de calibração através da adição das medidas de concentrações de 0,10; 0,20; 0,30; 0,40; 0,50; 0,60; 0,70; 0,80; 0,90 e 1,00 g/L de solução padrão de glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Adicionou-se 100,00 µL deste padrão à 300,00 µL de Fenol 5% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 1,50 mL de ácido sulfúrico concentrado (Vertec, Rio de Janeiro, Brasil), em seguida realizou a medida analítica a 480 nm em espectrofotômetro UV-Vis.

Posteriormente, 100,00 µL da amostra foram utilizados em triplicata, passando pelas mesmas condições descritas anteriormente para o padrão de glicose.

Açúcar não redutor

Após a realização das duas etapas anteriores, calculou-se a diferença entre a concentração de açúcar total e açúcar redutor no intuito de obter o valor da concentração de açúcares não redutores presentes nas amostras.

2.3 Informações do processo de produção artesanal da cerveja

O processo de brasagem é essencial para se obter uma boa cerveja como produto final, e tem-se como parte principal, além da matéria-prima utilizada, o controle de temperatura, a qual denomina-se Rampas de aquecimento, cuja:

- A primeira rampa acontece entre 45 – 55 °C, chamada de repouso proteico. É quando acontece a solubilização das proteínas, serve para melhorar a durabilidade da espuma.
- A segunda rampa acontece entre 55 – 65 °C, onde há a conversão de mais açúcares simples, um aumento na concentração da beta-amilase e proporciona uma cerveja mais alcoólica e seca.
- A terceira rampa acontece entre 67 – 72 ºC, a concentração de alfa-amilase está maior e ocorre a conversão de açúcares menores, caracterizando uma cerveja com mais corpo e complexa.
- A quarta rampa acontece em 78 °C e é denominada de mash-out, ocorrendo a inativação das enzimas[29].

A Tabela 2 caracteriza as rampas de aquecimento para as quatro cervejas em estudo, assim como relaciona a matéria prima utilizada e os seus respectivos processos.

Tabela 2: *Informações do processo de produção para os diferentes tipos de cerveja*

Tipo	**Rampa de aquecimento**		**Informação**	
	Temperatura (°C)	**Tempo (min)**	**Ingredientes/processo**	**Quantidade de lúpulo**
Weiss	43	15	Cevada + trigo	10 g para 20 L de cerveja / 60 min de fervura
	50	10		
	65-68	60		
	78	10		
APA	65-68	60	100% cevada com dry hopping	20 g para 20 L de cerveja / 60 g no dry hopping
	72	10		
	78	10		
Cream	65-68	60	Cevada + milho + aveia com dry hopping	70 g para 40 L de cerveja na fervura / 60 g no dry hopping
	76	5		
Red Ale	65-68	60	100% cevada	65 g para 40 L de cerveja na fervura / 50 g após a fervura
	76	5		

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Diferentes métodos espectrofotométricos têm sido utilizados para quantificação de fenólicos totais, compostos fenólicos específicos ou uma classe de fenólicos. Dentre eles, o método de Folin-Denis[30] é o mais utilizado para a determinação de fenólicos totais em vegetais. No entanto, este não é um método específico, pois determina também substâncias redutoras adicionadas aos alimentos ou naturalmente presentes que podem interferir nos resultados. Muitas vezes o reagente de Folin-Denis é substituído pelo de Folin-Ciocalteu[13]. O uso do reagente Folin-Ciocalteu consiste na mistura de ácidos fosfomolíbdico e fosfotungstico e outros reagentes, que são reduzidos pelos fenólicos presentes na amostra para óxido de tungstênio e óxido de molibdênio em meio alcalino, produzindo coloração azulada[10], como pode ser observado nos registros experimentais obtidos no laboratório (Figura 4).

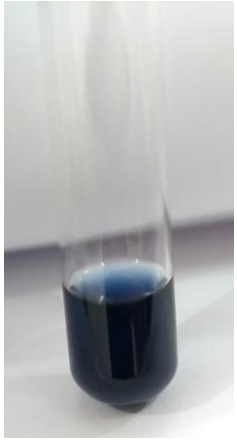

Figura 4**:** *Coloração apresentada dos compostos fenólicos na presença do reagente de Folin-Ciocalteu. (Autoria própria)*

O método de Folin-Ciocalteu é vantajoso por ser direto, simples e rápido, sendo desnecessário o tratamento especial da amostra, a não ser a diluição da mesma. Na Figura 5 é apresentada a reação de substâncias redutoras com o reagente de Folin-Ciocalteu.[31] No exemplo, o ácido gálico, em condição alcalina reage com o complexo fosfomolíbdico do reagente de Folin-Ciocalteu.

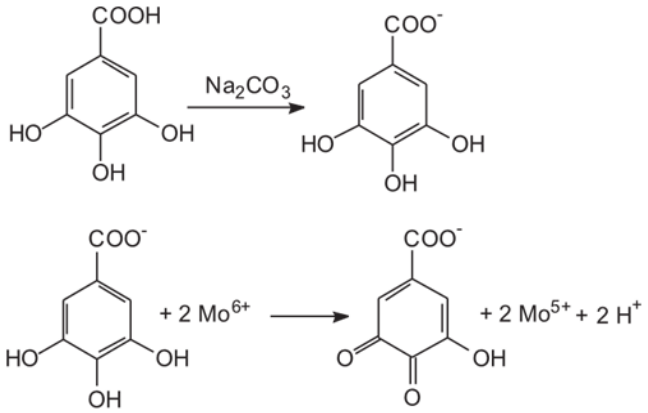

***Figura 5*:** *Reação do ácido gálico na presença do reagente de Folin-Ciocalteu.*[31]

As substâncias fenólicas apresentam um anel aromático em sua estrutura podendo ter uma ou mais hidroxilas ligadas ao anel. Sua estrutura química confere atividade redutora para esse grupo de substâncias, que podem atuar no sequestro de radicais livres (antioxidantes) ou doando elétrons. Entre as substâncias fenólicas, os flavonoides e os ácidos são os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais e apresentam-se amplamente distribuídas nas plantas.[32]

O cálculo da concentração de fenólicos totais na amostra pode ser realizado através da aplicação da equação da curva analítica obtida para concentrações crescentes de ácido gálico. A equação de regressão linear obtida está apresentada na Figura 6.

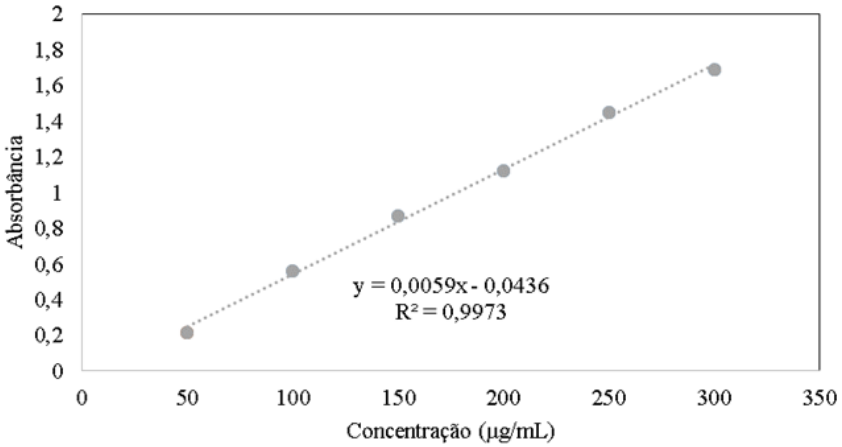

Figura 6: *Curva padrão de ácido gálico*

A partir da curva de calibração pode-se calcular a concentração de fenólicos totais presente nas amostras obtidas em diversas etapas do processo de fabricação das cervejas. As Figuras 7 a 10 apresentam os resultados obtidos para fenólicos totais nas cervejas do tipo APA, Cream, Red e Weiss, respectivamente.

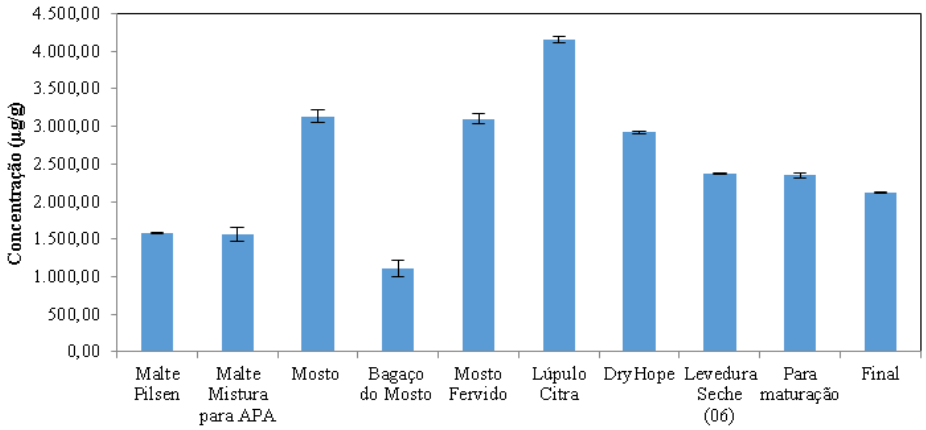

Figura 7: *Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo APA (n = 3).*

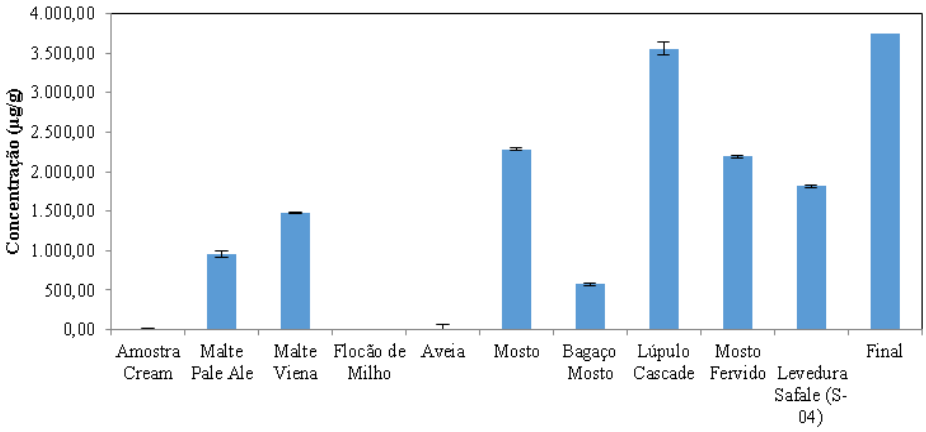

Figura 8: *Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream (n = 3).*

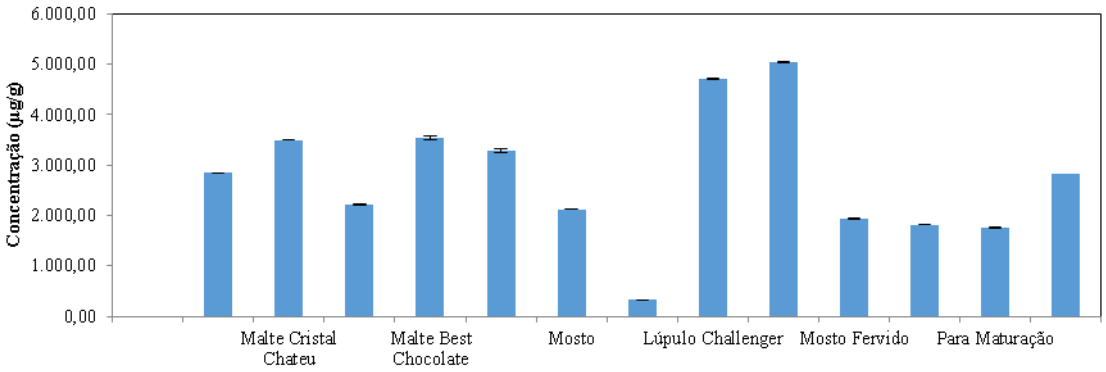

Figura 9: *Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo Red (n = 3).*

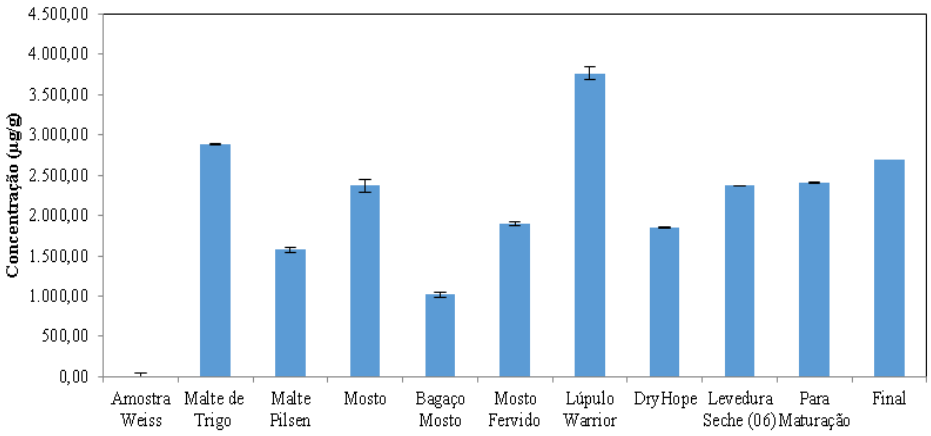

Figura 10: *Fenólicos totais presentes nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss (n = 3).*

Dentre os quatro tipos de cervejas estudadas, a que apresentou a maior concentração de fenólicos totais no produto final foi a do tipo Cream (≈ 3700 µg/g) e a que apresentou a menor concentração foi a do tipo APA (≈ 2100 µg/g). As cervejas do tipo Weiss e Red apresentaram concentrações intermediárias e muito próximas entre si (≈ 2700 µg/g).

Bomba (2016)[10] indica que no produto final da cerveja possa ter concentração de polifenólicos variando entre 1500-3500 µg/g. Os resultados apresentados nas Figuras 7 a 10 demonstram que existe concordância com os valores apresentados por Bomba. Apenas a cerveja do tipo Cream apresentou teor de fenólicos totais um pouco mais elevado.

Nas Figuras 7 a 10 destaca-se uma maior concentração de compostos fenólicos oriundos do lúpulo e do malte, tornando a bebida uma boa fonte de compostos fenólicos. Segundo Maciel e colaboradores (2013), os compostos derivados do lúpulo são mais fáceis de serem caracterizados que os da cevada, pois durante o processamento da bebida eles podem sofrer mudanças, principalmente durante a fervura com oxidação e polimerização de vários compostos fenólicos tornando-os de difícil caracterização.[14,33]

Geralmente os compostos fenólicos são encontrados na cerveja ligados a outros compostos, como glicosídeos e ésteres, no entanto também é possível encontrá-los em sua forma livre.[14] Dentre os fenólicos presentes na cerveja, Maciel e colaboradores (2013) identificaram a presença de compostos pertencentes ao grupo dos flavonoides, flavononas, flavonas, além dos taninos flobabênicos e catequinas. Registrou ainda a presença de ácidos fenólicos como ferúlico, cafeico e para-cumárico.[33] Estudos

indicam que o ácido ferúlico, cuja estrutura pode ser observada na Figura 11, é predominante como ácidos fenólicos na cerveja, representando entre 48 e 58%.[14]

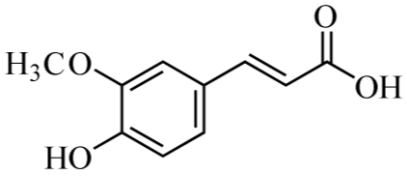

Figura 11: *Forma estrutural do ácido ferúlico.*

Segundo Maillard e Berset, os derivados do ácido cinâmico, como, por exemplo, o ácido ferúlico, podem se isomerizar em solução aquosa sob influência de luz UV. Isso explica o fato da baixa concentração do ácido ferúlico em alguns cultivares de cevada. O método extrativo aplicado e variações de genótipos também contribuem para baixas concentrações do ácido ferúlico.[34]

Segundo estudo realizado por Gorinstein e colaboradores[35], a concentração de ácido ferúlico, bem como de procianidinas e epicatequinas é significativamente maior na cerveja quando comparada ao vinho branco, conferindo à cerveja maior capacidade antioxidante. Já Lugasi[36] afirma que a capacidade antioxidante da cerveja é comparável à do vinho branco, no entanto é inferior à do vinho tinto.

Observa-se nas Figuras 7 a 10 que há uma redução no teor de fenólicos durante as etapas até o produto final. Esses resultados estão de acordo com os resultados apresentados por Fantozzi e colaboradores[37], os quais mostraram 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. Além disso, a composição final dos fenólicos na cerveja depende do processo de fermentação e da qualidade da matéria-prima utilizada (lúpulo e cevada).[38]

3.2 Determinação de Proteína Total

Para determinação de proteínas, fez-se uso do método de Bradford. Este método apresenta facilidade na condução da reação, rapidez, sensibilidade e possui poucos interferentes em diversos meios de análise, com faixa de detecção entre 20 e 200 μg mL^{-1}.[8] O método é baseado na interação entre o corante Coomassie brilliante blue (BG-250) e as macromoléculas de proteínas contendo aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH da reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm.[39] A Figura 12 apresenta a estrutura do BG-250 e as espécies absorventes do corante em diferentes valores de pH. Na Figura 13 observa-se a coloração formada durante o deslocamento do equilíbrio obtida durante os experimentos.

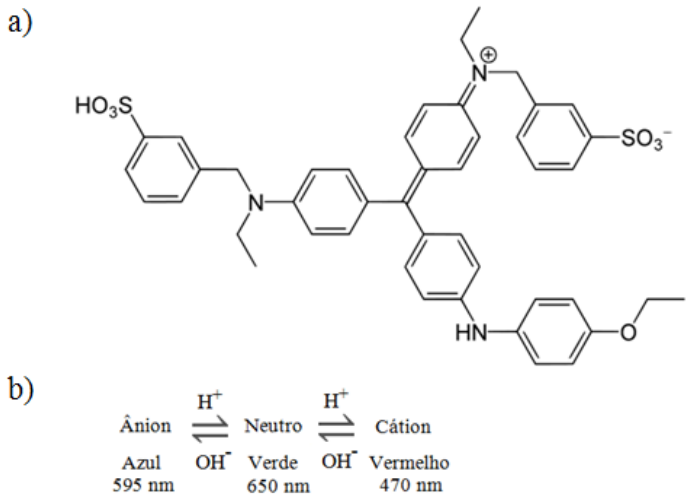

Figura 12: *a) Estrutura química do BG-250 e b) espécies absorventes do corante.*

Figura 13: *Coloração obtida durante a reação entre proteínas e o reagente BG-250. (Autoria própria)*

A curva de calibração, preparada a partir de solução padrão de albumina, está representada na Figura 14, assim como a equação da reta a qual foi empregada para o cálculo da concentração de proteínas presentes nas amostras.

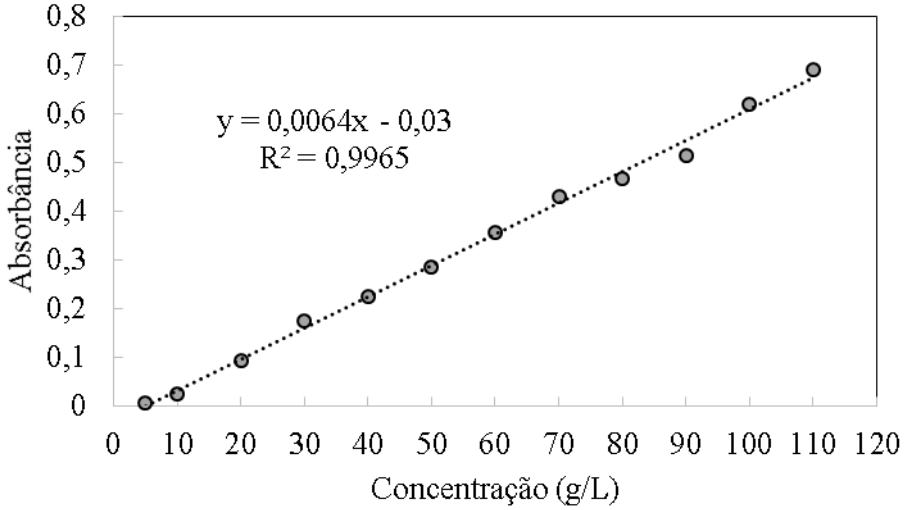

Figura 14: *Curva padrão de Albumina.*

A partir da curva de calibração pode-se calcular a concentração de proteína total presente nas amostras obtidas em diversas etapas do processo de fabricação das cervejas. As Figuras 15 a 18 apresentam os resultados obtidos para proteína total nas cervejas do tipo APA, Cream, Red e Weiss, respectivamente.

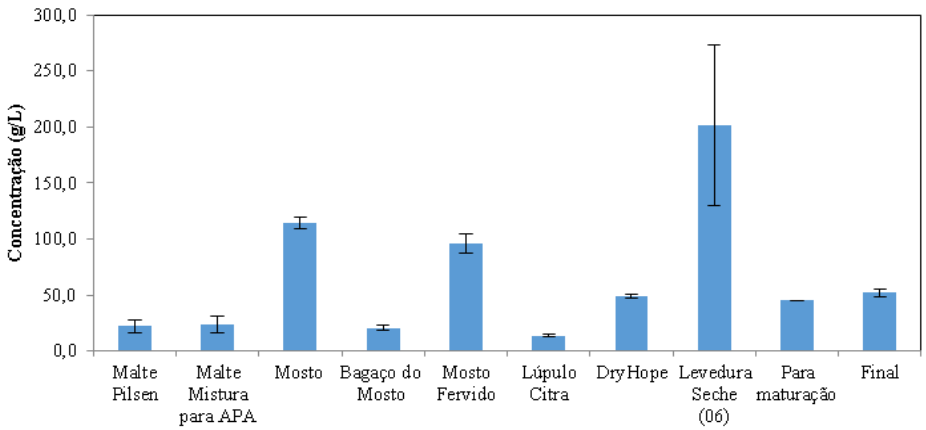

Figura 15: *Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA (n = 3).*

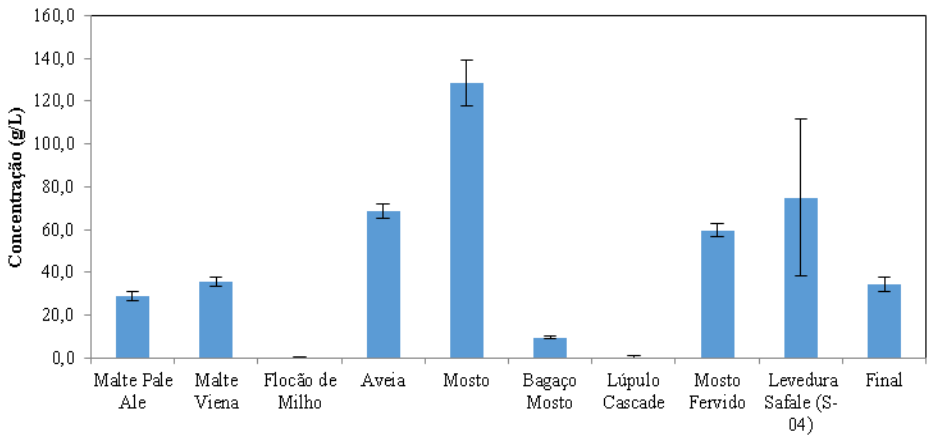

Figura 16: *Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream (n=3).*

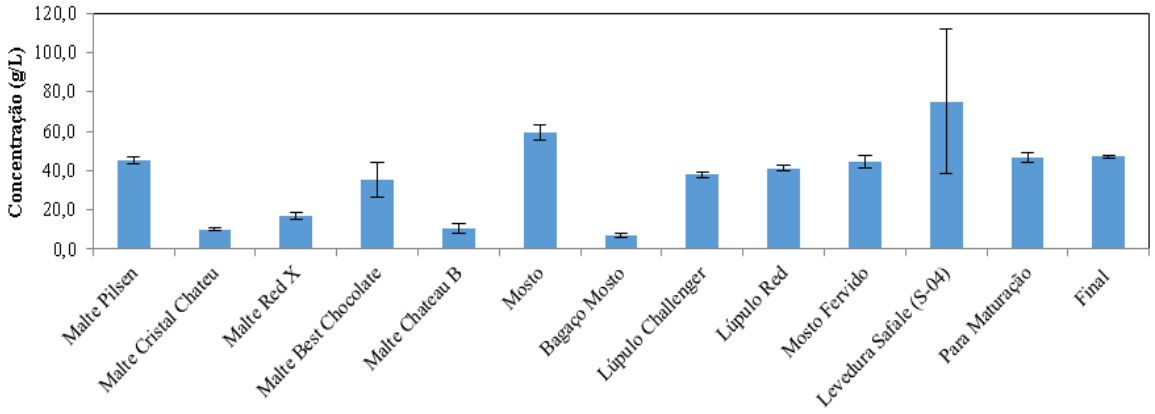

Figura 17: *Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red (n=3).*

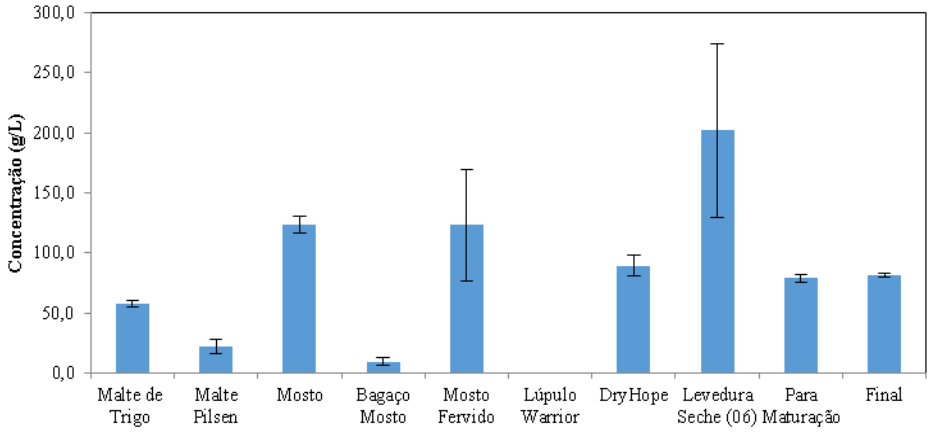

Figura 18: *Proteína total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss (n=3).*

Os gráficos das Figuras 15 a 18 demonstram que os maiores teores de proteína total são obtidos principalmente nas leveduras. Esses resultados estão de acordo com a composição centesimal da biomassa apresentada pelas leveduras do tipo

Saccharomyces sp., que estão entre 45-50 % de proteína, conforme apresentado por Caballero-Córdoba e colaboradores.[40]

O mosto das cervejas é também rico em proteínas. Durante o aquecimento acontece a ativação enzimática, os grãos do amido começam a se solubilizar e a enzimas começam a entrar em solução. Entre 50-55 ºC ocorre o repouso proteolítico, etapa que acontece a quebra de algumas proteínas do malte, formando proteínas menores, peptídeos e aminoácidos, conforme Tabela 2, apenas a Weiss passa por esse repouso. Entre 60-72 ºC ocorre o repouso de sacarificação, parada pela qual todas as cevejas estudas passam, conforme Tabela 2, e nesta etapa a alfa-amilase e beta-amilase são as principais enzimas presentes.[41]

O teor de proteínas encontrado no malte, em todos os tipos de cerveja, foi menor do que 5%. Segundo Wamser e Mundstock[42], a qualidade de grãos para a produção de malte é prejudicada quando o teor de proteínas é maior que 12%. O excesso de proteínas no grão resulta em menor teor de amido e, conseqüentemente, de carboidratos fermentescíveis. A menor quantidade de carboidratos aumenta o tempo de maltagem para que ocorram as modificações necessárias neste processo. Além disso, o excesso de proteínas no grão aumenta a quantidade de proteínas solúveis no malte e no mosto, resultando em cerveja de baixa estabilidade.[43]

Estudos registram que a estabilidade da espuma não depende somente da capacidade individual das proteínas e dos polipeptídios, mas também das proporções relativas das albuminas e hordeínas.[44] As hordeínas são proteínas de armazenamento, existentes nos grãos de cevada, representando cerca de 40% da quantidade total de proteína encontrada no grão.[19]

3.3 Determinação de açúcares

Açúcar redutor

Açúcares redutores são carboidratos que possuem seu grupo carbonílico livre e são capazes de se oxidar na presença de agentes oxidantes em solução alcalina. Essa oxidação ocorre somente quando o carbono carbonílico é oxidado a um grupo carboxílico.[45]

Antes da determinação da quantidade de açúcares redutores nas amostras foi feita a curva de calibração, preparada a partir de solução padrão de glicose e o DNS. A Figura 19 apresenta a curva de calibração e o coeficiente de determinação (R^2) obtido.

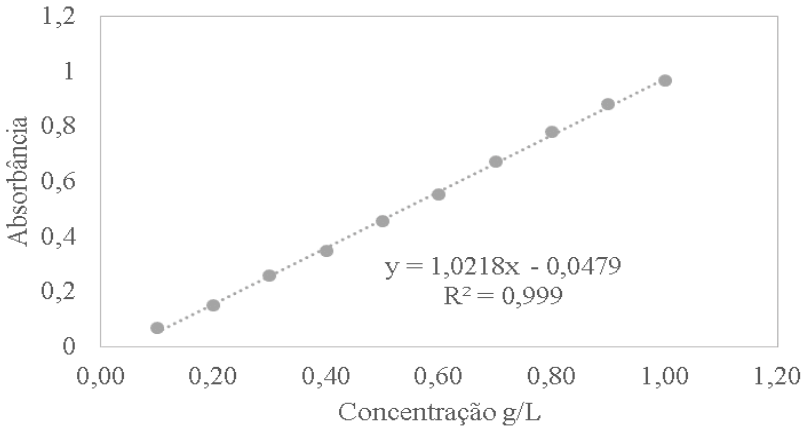

Figura 19: *Curva padrão de glicose.*

Para a determinação de açúcar redutor fez-se uso do método DNS. Neste método, o agente oxidante ácido 3,5-dinitrosalicílico, sob condições alcalinas, reage com o carbono carbonílico de açúcares redutores e se reduz a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, (Figura 20), um composto corado que apresenta absorção máxima de luz em 540 nm.[45] A reação forma ainda o ácido aldônico, um ácido de açúcar obtido pela oxidação do grupo aldeído de uma aldose a ácido carboxílico.[21]

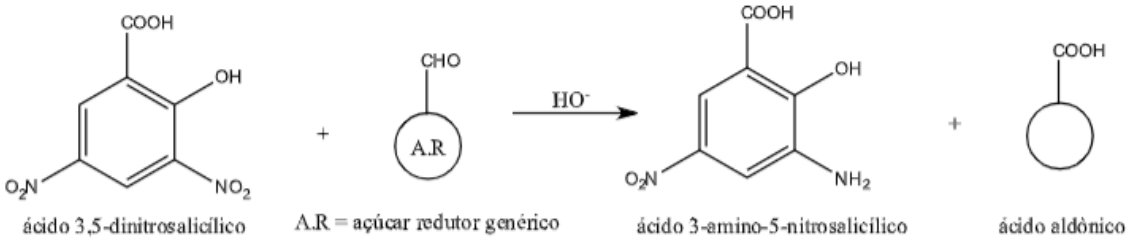

Figura 20: *Reação de redução do DNS.*[21]

Na Figura 21 observa-se a coloração formada na reação para determinação de açúcar redutor nas amostras. As Figuras 22 a 25 mostram as variações de concentração de açúcar redutor durante o processo de fabricação das cervejas do tipo APA, Cream, Red e Weiss, respectivamente.

Figura 21: *Reação obtida na determinação de açúcar redutor usando DNS. (Autoria própria)*

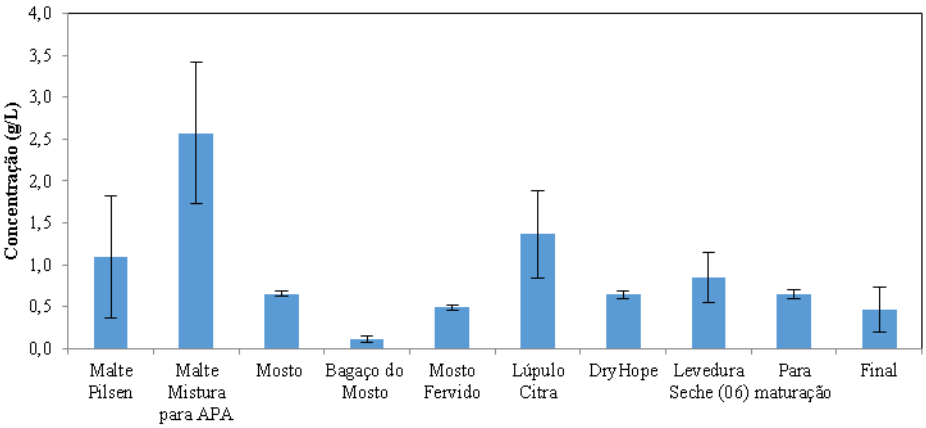

Figura 22: *Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA (n = 3).*

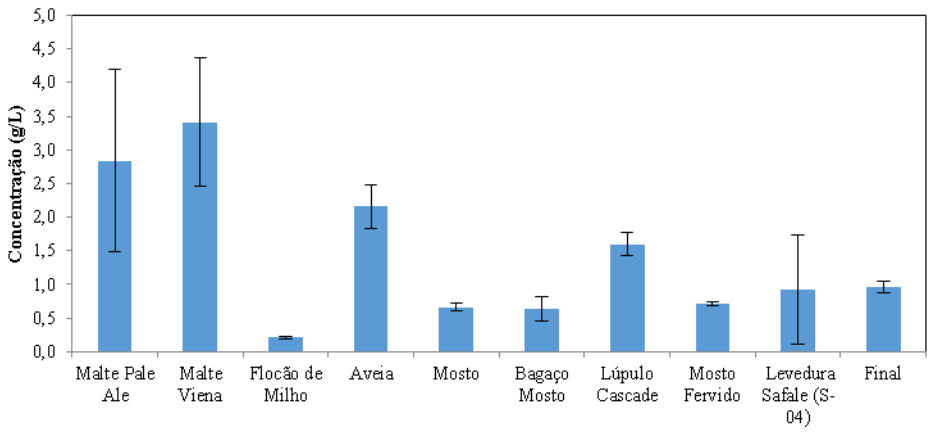

Figura 23: *Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream (n = 3).*

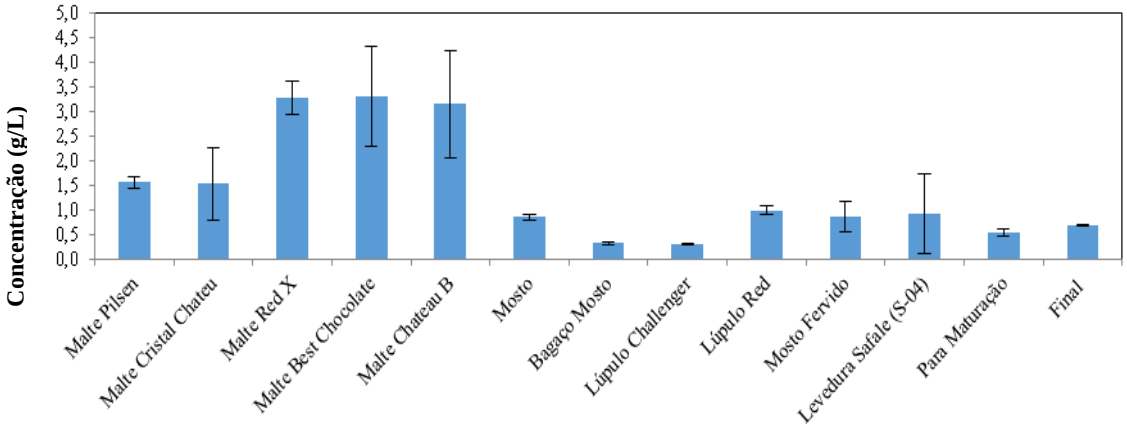

Figura 24: *Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red (n = 3).*

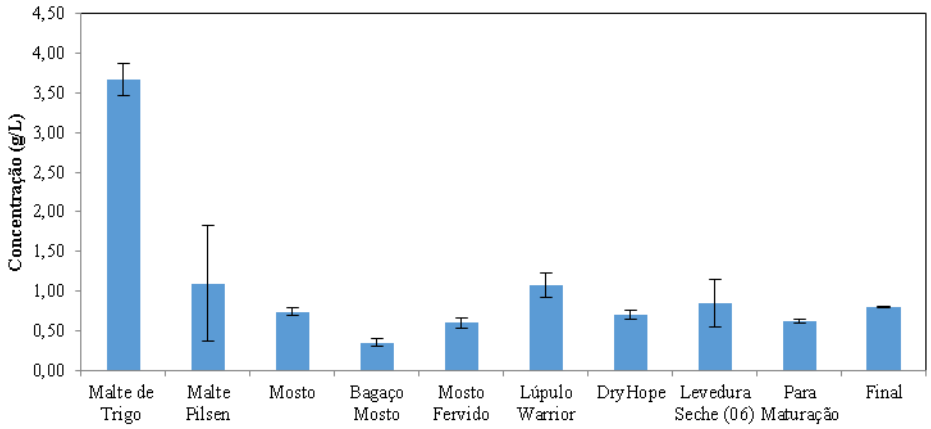

Figura 25: *Açúcar redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss (n = 3).*

A concentração de açúcar redutor foi maior nos maltes. Isso é comum, pois o malte é um componente rico em açúcares naturais necessários à fermentação. Além

disso, o malte é responsável pela cor da cerveja, pelo doce sabor maltado, pelas dextrinas que dão corpo a cerveja e pela proteína para formar uma boa espuma. Durante a etapa de preparação do mosto, o amido e as proteínas presentes no malte são transformadas em açúcares e outras substâncias. Em estudo apresentado por Silva (2005), o grão de cevada e malte de cevada apresenta teor de açúcar na faixa de 0,5 a 1,0% e 8 a 10%, respectivamente.[46]

Os principais açúcares redutores presentes no malte são a glicose e a frutose e são dois dos principais monossacarídeos presentes em processos fermentativos. Os dois apresentam seis carbonos (hexoses) que se diferenciam pela forma cíclica e pela posição do grupo carbonila em suas estruturas.[45] Alguns dissacarídeos, como a maltose e a lactose, também estão presentes como principais açúcares redutores.

A presença de açúcares no mosto naturalmente é menor do que nos maltes originais, pois os açúcares do mosto servirão de substrato para as leveduras no processo de fermentação. Nessa fase, ocorre a transformação do mosto em cerveja e o processo dá origem a gás carbônico e álcool, além de ésteres (acetato de isoamila, acetato de etila, acetato de n-propila), ácidos (acético, propiônico) e álcoois superiores (1-propanol, 2-metil-1-butanol, 2-metil-1-propanol e 3-metil-1-butanol), como produtos secundários. Um mosto mais fermentável dará origem a uma cerveja com teor alcoólico maior e menos encorpada, no entanto, um mosto menos fermentável diminui o teor alcoólico e torna a cerveja mais encorpada.[9]

Observa-se que no produto final as concentrações de açúcar redutor presente em todos os quatro tipos de cervejas são próximas e não ultrapassam 1,0 g/L, isso porque nem todos os açúcares redutores são fermentáveis, o que explica o fato de a levedura não ter consumido totalmente esses açúcares durante a fermentação.[47] Entre os açúcares redutores não fermentáveis podem ser citados a maltotetraose, maltopentaose, maltohexaose e dextrinas superiores.

Quanto maior a concentração de açúcares redutores mais adocicado o sabor do produto. Cervejas que possuem teor alcoólico maior apresentam também maior concentração de açúcares redutores.[48]

Açúcar total

Para a determinação de açúcar total, previamente foi feita a curva de calibração, preparada a partir de solução padrão de glicose, fenol 5% e ácido sulfúrico. A Figura 26 apresenta a curva de calibração e o coeficiente de determinação (R^2) obtido.

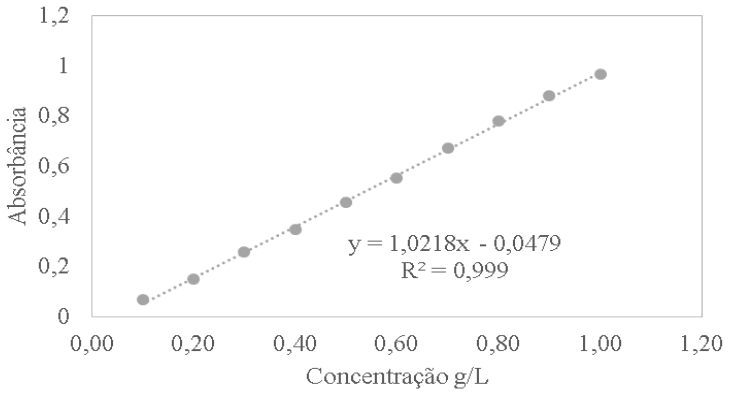

Figura 26: *Curva padrão de glicose.*

A técnica usada para determinação de açúcar total baseia-se na determinação de açúcares simples polissacarídeos e seus derivados incluindo os metilésteres com grupos redutores livres, após a desidratação dos mesmos pelo ácido sulfúrico e subsequente complexação dos produtos formados com o fenol. A mudança de cor da solução, observada na Figura 27, é medida na região do visivel, em 480 nm, e é proporcional a quantidade de açúcares presente nas amostras.[21] As Figuras 28 a 31 mostram as variações de concentração de açúcar total durante o processo de fabricação das cervejas do tipo APA, Cream, Red e Weiss, respectivamente.

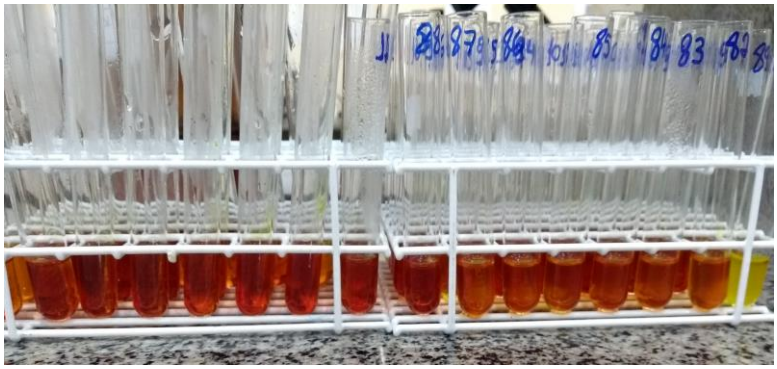

Figura 27: *Coloração obtida na reação para determinação de açúcar total. (Autoria própria)*

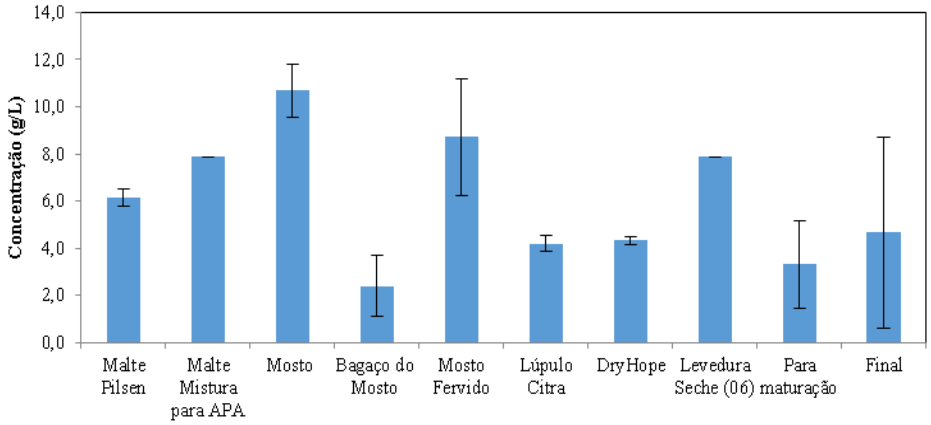

Figura 28: *Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA (n = 3).*

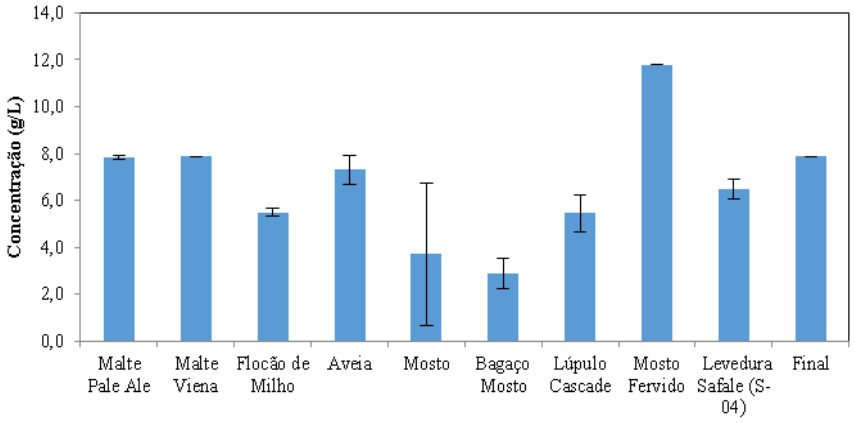

Figura 29: *Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream (n = 3).*

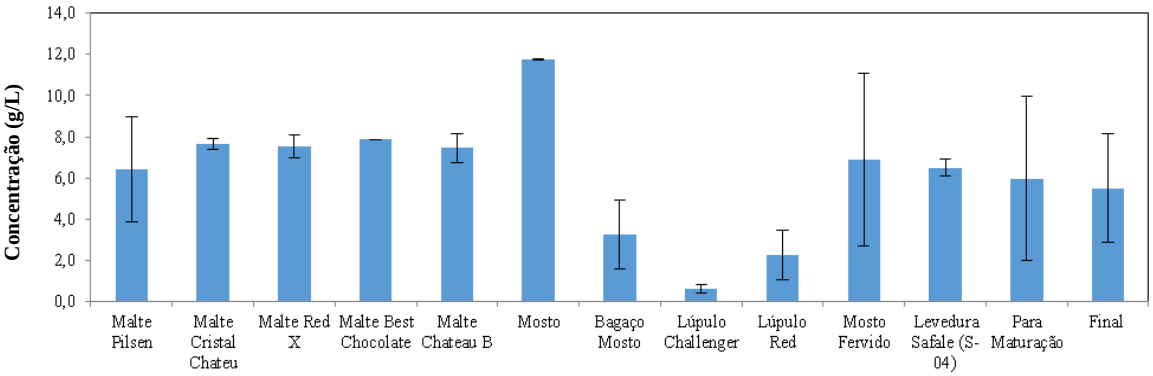

Figura 30: *Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red (n = 3).*

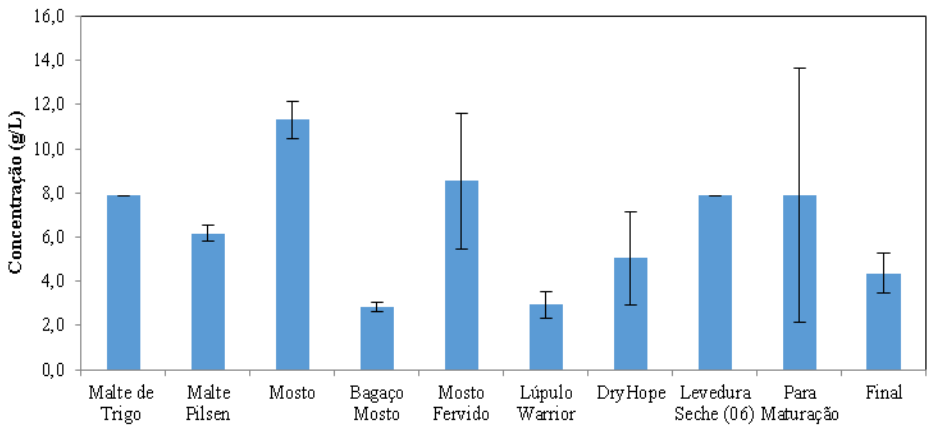

Figura 31: *Açúcar total presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss (n = 3).*

Analisando as Figuras 28 a 31, observa-se que, inicialmente, a concentração de açúcares totais é maior, em destaque para os respectivos mostos, e há uma redução durante o processo de elaboração das cervejas. Isso ocorre devido ao açúcar presente nos ingredientes serem convertidos em álcool durante a preparação. Parte do teor de açúcar ainda se mantém presente no produto final pelo fato de haverem açúcares não fermentáveis, os quais não são convertidos em álcool.[49] Estudos afirmam que cerveja com alto teor alcoólico resulta em maior concentração de açúcares totais presentes.[22]

Para o aumento da produção utiliza-se da alta densidade do mosto, ou seja, um aumento na concentração de açúcares. Com isso, obtém-se uma cerveja com alto teor alcóolico que posteriormente é diluida, o que diminui a necessidade de investimentos em novos tanques e equipamentos.[20] No entanto, a quantidade de açúcar empregada na elaboração da bebida não pode ser superior a 15% na cerveja clara, 50% na cerveja escura e 10% na cerveja extra, em relação ao seu extrato primitivo, logo, a concentração de açúcar deve ser de 65 a 76 °Brix (que significa g de açúcar/100 mL de mosto) [50]

Em virtude do seu largo emprego na indústria fermentativa, a detecção desses carboidratos nos mostos mostra-se importante não só no início dos processos citados, para se saber o percentual teórico de etanol que pode ser obtido, como também durante e no fim da fermentação, para se avaliar a velocidade de consumo dessas fontes de carbono e o quanto de açúcar deixou de ser fermentado, reduzindo a eficiência do processo e/ou alterando a qualidade do produto final, bem como avaliar a possibilidade de ocorrer refermentação após o engarrafamento de bebidas.[45]

Açúcar não redutor

Para a determinação de açúcar não redutor, utilizou-se o cálculo da diferença entre as concentrações de açúcar total e açúcar redutor anteriormente citadas. As Figuras 32 a 35 mostram as variações de concentração de açúcar não redutor durante o processo de fabricação das cervejas do tipo APA, Cream, Red e Weiss, respectivamente.

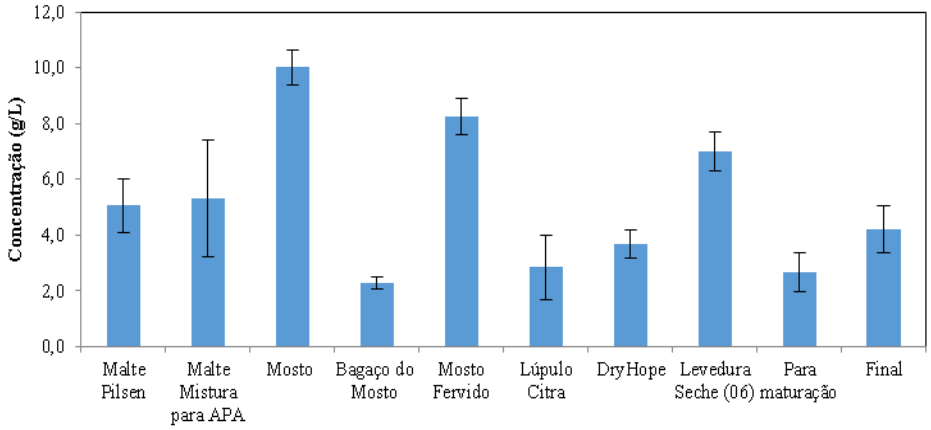

Figura 32: *Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo APA (n = 3).*

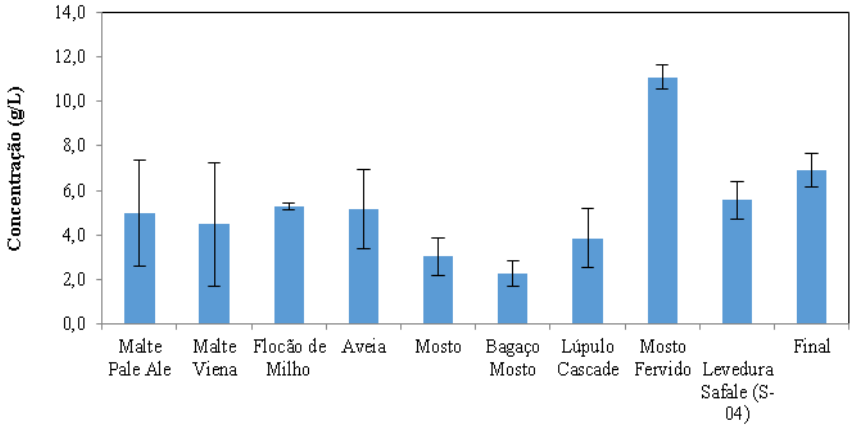

Figura 33: *Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Cream (n = 3).*

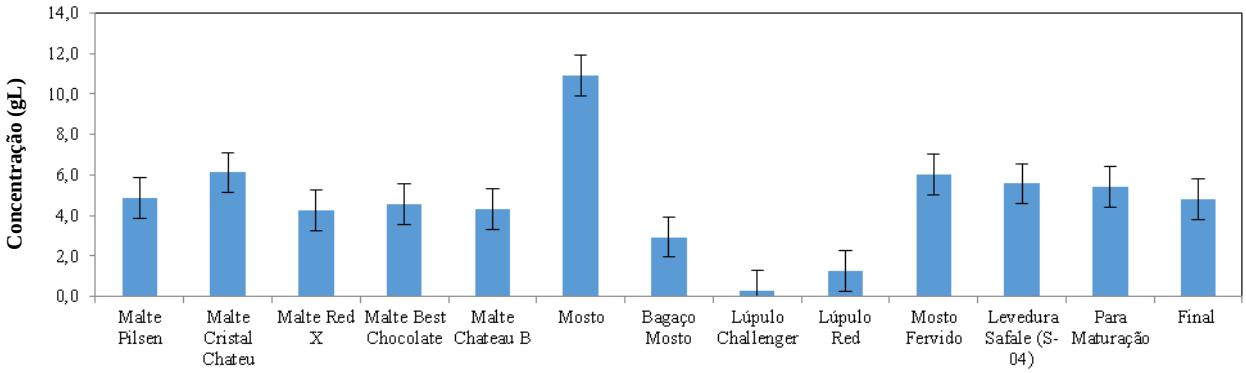

Figura 34: *Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Red (n = 3).*

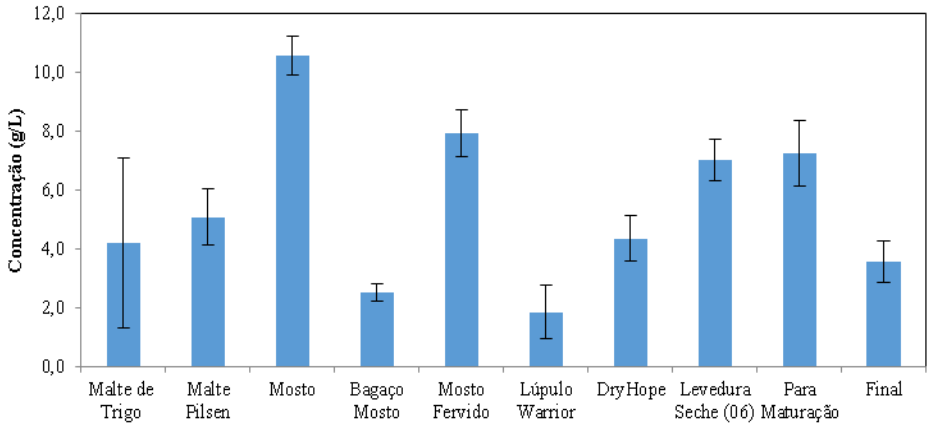

Figura 35: *Açúcar não redutor presente nas diferentes etapas da cerveja tipo Weiss (n = 3).*

Os açúcares não redutores são carboidratos cujos carbonos anoméricos estão envolvidos em ligações glicosídicas.[45] Necessitam sofrer hidrólise para oxidar, como a sacarose, que é formada pela ligação entre o grupo funcional aldeídico de uma molécula de glicose e o grupo funcional cetônico de uma molécula de frutose. A hidrólise de açúcares não redutores é geralmente feita na presença de ácido forte ou com o uso de enzimas.[51]

Uma cerveja com maior concentração de açúcares redutores e menor quantidade de açúcares não redutores e polissacarídeos é uma cerveja menos encorpada e apresenta maior teor alcoólico por conta da conversão dos açúcares redutores em etanol e dióxido de carbono oriundo do processo fermentativo. Dessa forma, as leveduras irão converter os açúcares redutores e deixar de consumir os não redutores. Em contrapartida, em uma cerveja com a concentração maior de açúcar não redutor prevê-se a obtenção de um produto mais encorpado por conta dos polissacarídeos que não serão consumidos pelas leveduras.[52]

As cervejas apresentaram concentrações de açúcar não redutor no produto final entre 4,0 e 6,0 g/L. A cerveja do tipo Cream foi a que apresentou a maior concentração, em média 6,0 g/L. Naturalmente, a quantidade de açúcar não redutor no mosto das cervejas é mais pronunciada e vai reduzindo durante o processamento.

3.4. Avaliação dos resultados durante as etapas de fabricação

Para facilitar a compreensão, os resultados foram compilados observando os diferentes componentes na mesma etapa/ingrediente, conforme apresentado nas Figuras 36 a 39.

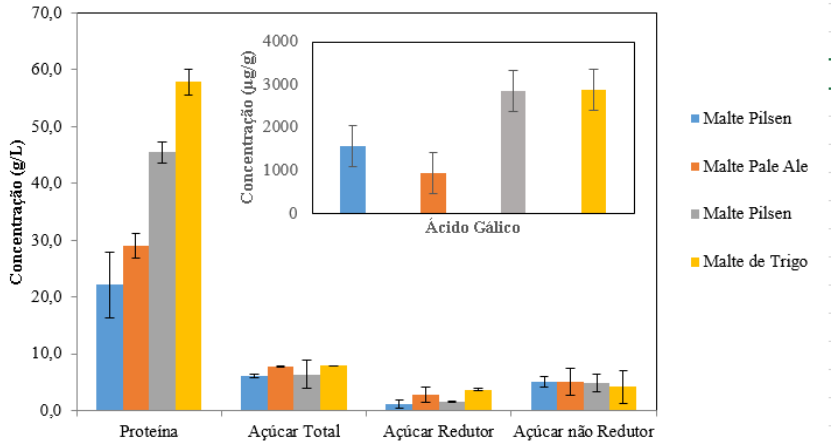

Figura 36: *Comportamento dos componentes no malte base.*

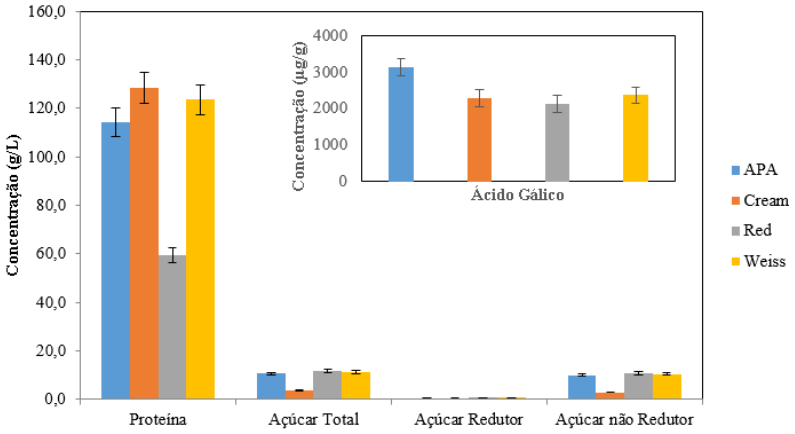

Figura 37: *Comportamento dos componentes no mosto.*

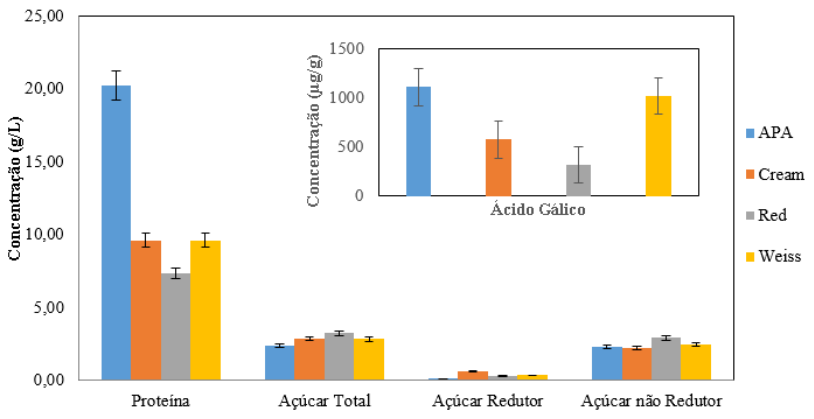

Figura 38: *Comportamento dos componentes no bagaço do mosto.*

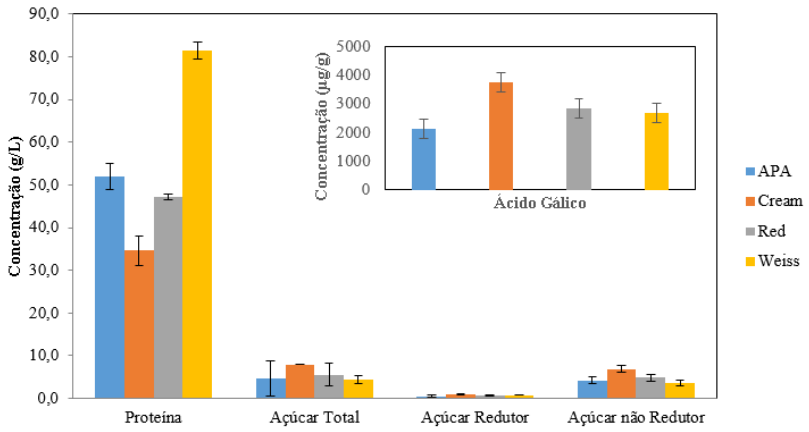

Figura 39: *Comportamento dos componentes no produto final.*

Observa-se, nas Figuras 36 a 39, um destaque nas concentrações de proteínas durante as etapas em todas as cervejas, podendo afirmar que não há perdas significativas durante o processo e que a quantidade no produto final é relevante, visto que um déficit de protéina no organismo pode causar fadiga, queda de cabelo, perda de massa muscular, gases, constipação e deixa o corpo mais exposto a infecções e resfriados, pois as proteínas contribuem para regular o sistema imunológico.

Observa-se ainda que as concentrações dos compostos fenólicos são as mais baixas em comparação aos demais componentes, no entanto, a cerveja ainda é uma boa fonte de polifenóis, já que possui capacidade antioxidante moderada e o consumo de substâncias antioxidantes naturais na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos.

Em relação aos açúcares, pode-se observar que os não redutores estão em maior concentração que os redutores, e que a concentração de ambos diminui quando

comparados ao produto final, logo, pode-se afirmar que parte desses açúcares ficam armazenados no bagaço do mosto, parte é fermentado e uma pequena parte continua presente na cerveja que será consumida.

4. CONCLUSÃO

Diante dos resultados que foram apresentados e discutidos neste trabalho, pode-se afirmar que a técnica espectrofotométrica, assim como todas as reações utilizadas na metodologia, foi de fato eficiente para as análises. Os resultados demonstraram que a cerveja do tipo Weiss tem uma maior concentração de proteína (≈ 4,3 g/L), a do tipo Cream possui maior quantidade de açúcares (≈ 7,8; ≈ 0,9; ≈ 6,9 g/L) e compostos fenólicos (≈ 3700 µg/g), enquanto a do tipo APA apresenta a menor concentração de fenólicos totais (≈ 2100 µg/g).

Além disso, ressalta-se o papel das cervejarias artesanais, visto que vem prezando por uma cerveja tradicional e de qualidade. Pôde-se observar ainda que, mesmo a cerveja passando por diferentes etapas durante o processo de fabricação, parte considerável dos nutrientes permanecem no produto final, além de que todos os valores encontrados estão em concordância com estudos anteriores. No entanto, cada cerveja possui composição distinta, e esta diferença pode ser atribuída à qualidade, quantidade e ainda ao tipo de matéria-prima utilizada, já que cada cerveja possui uma receita peculiar.

Por fim, este estudo foi importante para caracterizar melhor um produto feito na cidade de Jequié-BA e que apresenta potencial para ser comercializado na região.

5. PERSPECTIVAS

Diante a relevância do estudo e visando a complementaridade da pesquisa, é importante o desenvolvimento de projetos futuros que abordem a caracterização inorgânica da matriz, que pode ser realizada através da aplicação de técnicas multielementares. É interessante ainda estudos sobre especiação química e biodisponibilidade dos compostos estudados.

Neste estudo, quatro tipos de cervejas foram avaliados durante vários processos. Estudos utilizando uma maior variedade de cervejas artesanais, bem como modificações ou incorporações de adjuntos, componentes inorgânicos, entre outros, no preparo deste produto são bastante atrativos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] Mega, J. F.; Neves, E.; **A Produção Da Cerveja No Brasil**. *Revista Citino*, 2011.

[2] Mathias, T. R. S.; Aguiar, P. F.; Almeida, J. B.; Mello, P. P. M.; Sérvulo, E. F. C.; **Brewery Waste Reuse For Protease Production By Lactic Acid Fermentation.** *Food Technol. Biotechnol*, 2017.

[3] Leão, P. R. P.; Medina, A. L.; Vieira, M. A.; Ribeiro, A. S.; **Beer Sample Decomposition Using A Reflux System For The Monoelementar Determination By FAas/Aes And Multielementar Determination By Mip Oes.** *Brazilian Journal Of Food Technology*, 2018.

[4] Marcusso, E. F.; Müller, C. V.; **Anuário Da Cerveja No Brasil 2018: Crescimento E Inovação.** *Beer Art - Portal Da Cerveja*, 2019.

[5] http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/pasta-publicacoes-DIPOV/as-cervejas-continuam-a-crescer-pdf.pdf Acessado em março de 2019.

[6] Nachel, M.; Ettlinger, S.; **Cerveja Para Leigos: Tornando tudo mais fácil.** *Alta Books editora*, Rio de Janeiro, 2014

[7] http://www.cervejasdomundo.com/Ale.htm Acessado em Maio 2019.

[8] https://biologiavegetal.com/aula-44-dosagem-de-proteinas-pelo-metodo-de-bradford/ Acessado em Agosto 2019.

[9] Rosa, N. A.; Afonso, J. C.; **A Química Da Cerveja.** *Quím. Nova Esc.*, V. 37, 2015.

[10] Bomba, T. M. C. R.; **Perfil Bioquímico Da Cerveja Impala Em Polifenóis, Proteínas E Nível De Turbidez**. *Universidade Católica De Moçambique Faculdade De Engenhariadepartamento De Engenharia Alimentar* Chimoio - Mn: 2016.

[11] Archela, E.; Dall'antonia, L. H.; **Determination Of Phenolic Compounds In Wine: A Review**. *Semina: Ciências Exatas E Tecnológicas*, 2013.

[12] Bezerrai, A. S.; Nörnberg, J. L.; Lima, F. O.; **Climatic Parameters And Variation Of Phenolic Compounds In Barley**. *Ciência Rural* V.43, N. 9, 2013.

[13] Angelo, P. M.; Jorge, N.; **Phenolic Compounds In Foods – A Brief Review.** *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 1-9, 2007.

[14] Siqueira, P. B.; Bolini, H. M. A.; Macedo, G. A.; **O Processo De Fabricação Da Cerveja E Seus Efeitos Na Presença De Polifenóis**. *Alim. Nutr*, V.19, N.4, 491-498, 2008.

[15] Freitas, G. L.; **Potencial Antioxidante E Compostos Fenólicos Na Cerveja, Chopp, Cevada (*Hordeum Vulgare* L.) E No Bagaço De Brassagem.** *Dissertação de Mestrado*, UFSC, 2006.

[16] Freitas, G. L; Kuskoski, E. M; Gonzaga, L.; Fett, R.; **Avaliação Da Atividade Antioxidante De Diferentes Cervejas Aplicando Os Métodos Abts E Dpph** *Alim. Nutr., Araraquara* v.17, n.3, p.303-307, 2006.

[17] Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M; Brandão, M. S. B.; Chaves, M. H.; **Fenóis Totais E Atividade Antioxidante De Cinco Plantas Medicinais.** *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.

[18] Rebello, M. S.; Pozza, F. F.; **Revisão-Produção De Cerveja**. *Revista Agrogeoambiental*, 145-155, 2009.

[19] Silva, F.; Ferreira, I. M. P. L. V. O.; Teixeira, N.; **Polipeptídeos E Proteínas Com Influência Na Qualidade Da Espuma Da Cerveja E Métodos Analíticos Utilizados No Seu Estudo.** *Quim. Nova*,V. 29, N. 6, 1326-1331, 2006.

[20] Alves, L. M. F.; **Análise Fisico-Quimica De Cervejas Do Tipo Pilsen Comercializadas Em Campina Grande Na Paraíba**. Campina Grande*: Universidade Estadual Da Paraíba* , 2014.

[21] Silva, R. D. N.; Monteiro, V. N.; Assis, E. M.; **Comparação De Métodos Para A Determinação De Açucares Redutores E Totais Em Mel.** *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 337-341, 2003.

[22] Silva, A. E.; Colpo, E.; Oliveira, V. R.; Junior, C. G. H.; Hecktheuer, L. H. R.; Reichert, F. S.; **Elaboração De Cerveja Com Diferentes Teores Alcoólicos Através De Processo Artesanal.** *Alim. Nutr., Araraquara* v.20, n.3, 369-374, 2009.

[23] Kempk, A. P.; Thomé, B. C; Conto, R. M.; **Produção de cerveja artesanal tipo ale utilizando mel de diferentes floradas como adjunto.** *Brazilian Journal of Food Research,* Campo Mourão, v. 8, n. 1, 105-125. 2017.

[24] Pohl, P.; **Determination and fractionation of metals in beer: A review.** *Poland, Food Additives and Contaminants,* V. 25, N. 6, 693–703, 2008.

[25] Chen, X.; Wang, J.; Li, Q. **Simultaneous Determination of Maltooligosaccharides in Beer Using HPLC-ELSD and Their Influence on Beer Foam Stability**. *J. Am. Soc. Brew. Chem*. 78-83, 2015

[26] Marques, D. R.; Cassisa, M. A.; Quelhasb, J. O. F.; Bertozzic, J.; Visentainerd, J. V.; Oliveirad, C. C.; Monteiroa, A. R. G. **Characterization of Craft Beers and their Bioactive Compounds.** *Chemical Engineering Transactions* V. 57, 1747-1752, 2017.

[27] Machado, E. R.; **Desenvolvimento e caracterização de cerveja artesanal com adição de cacau.** *Dissertação de Mestrado,UFSM*, 2017.

[28] Bradford, M. M.; **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, 72:248-54, 1976.

[29] http://www.cervejahenrikboden.com.br/mostura-brassagem Acessado em Outubro 2019.

[30] Sartori, C. J.; Castro, A. H. F.; Mori, F. A.; **Teores de Fenóis Totais e Taninos nas Cascas de Angico-vermelho (Anadenanthera peregrina)**. *Floresta e Ambiente*, 21(3):394-400, 2014.

[31] Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S.; **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** *Quim. Nova*, V. 32, N. 3, 689-702, 2009.

[32] Pires, J.; Torres, P. B.; Santos, D. Y. A. C,; Chow, F.; **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas.** *Instituto de Biociências*, Universidade de São Paulo São Paulo, SP, Brasil, 1-5, 2017.

[33] Maciel, D. C.; Elói, L. M. H.; **Compostos fenólicos em diferentes marcas de cerveja: comparação qualitativa de diferentes marcas e sua relação com a saúde humana.** *Revista Uniara*. v.16, n 1, 41-52, 2013.

[34] Maillard, M.N.; Berset, C.; **Evolution of antioxidant activity during kilning: role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, n.7, 1789-1793, 1995.

[35] Gorinstein, S.; Caspi, A.; Zemser, M.; Trakhtenberg, S.; **Comparative contents of some**

phenolics in beer, red and white wines. *Nutr. Res.*,v. 20, n. 1, 131-139, 2000.

[36] Lugasi, A.; **Polyphenol content and antioxidant properties of beer.** *Acta Alim.* v. 32, n.2, 181-192, 2003.

[37] Fantozzi, P.; Montanari, L.; Mancini, F.; Gasbarrini, A.; Addolorato, G.; Simoncini, M.; Nardini, M.; Ghiselli, A.; Scaccini, C.; ***In vitro* antioxidant capacity from wort to beer.** *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.*, v. 31, **221-227, 1998.**

[38] 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 alchool-free beers.** *J. Cromatography A*, v. 1054, 175-180, 2004.

[39] Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V,; Lichtig, J.; **Determinação De Proteínas Totais Via Espectrofometria: Vantagens E Desvantagens Dos Métodos Existentes.** *Química Nova*, 787-793. 1998.

[40] Córdoba, G. M. C.; Pacheco, M. T. B.; Sgarbieri, V. C.; **Chemical composition of yeast biomass (*Saccharomyces*sp.) and protein nutritive value of integral or mechanically ruptured cells.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 17, 102-106, 1997.

[41] Fernandes, L. M.; **Viabilidade de produção e caracterização de cerveja artesanal com acerola (*Malpighia emarginata DC*)** *Dissertação de Mestrado, UFPB*, 2017.

[42] Wamser, A. F.; Mundstock, C. M.; **Protein content in barley seeds affected by nitrogen application in different growth stages.** *Ciência Rural*, v.37, n.6,1571-1576, 2007.

[43] FLORIANI, A.P. **Cevada cervejeira: características bioquímicas**. *UFRGS, Porto Alegre*, 2002.

[44] *Bamforth, C.W.; Milani, C.;* ***The foaming of mixtures of albumin and hordein protein hydrolysates in model systems.*** *Food Agric. 2004, 84, 1001-1004.*

[45] Santos, A. A.; Deoti, J. R.; Müller, G.; Dário, M. G.; Stambuk, B. U.; Junior, S. L. A., **Microwell plate-based method for the determination of reducing sugars with the DNS reagente.** *Braz. J. Food Technol.*, v. 20, 2017.

[46] Silva, D. P. **Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares.** *Tese de doutorado FAENQUIL*, p.175. São Paulo, 2005.

[47] Fernandes, L. M.; **Viabilidade de produção e catacterização de cerveja artesanal com acerola (Malpighia emarginata DC),** *Universidade Federal da Paraíba*, Dissertação de Mestrado, 2017;

[48] Fregonesi, F. G.; Barga, M. C.; Ribeiro, C. N. M.; Maluf, D. F.; **Adição de Nutrientes à Fermentação da Cerveja Visando Alterações Metabólicas na Produção de Ésteres.** *Revista Eletrônica Biociências, Biotecnologia e Saúde*, Curitiba, 2014

[49] Sleiman, M.; Venturini Filho, W. G.; Ducatti, C.; Nojimoto, T.; **Determinação Do Percentual De Malte E Adjuntos Em Cervejas Comerciais Brasileiras Através De Análise Isotópica.** *Ciênc. agrotec., Lavras*, v. 34, n. 1, 163-172, 2010.

[50] Rebello, M. Sc. F. F. P.; **Produção De Cerveja- Revisão -;** *Revista Agrogeoambiental*, 2009.

[51] Demiate, I. M.; Wosiacki, G.; Czelusniak, C.; Nogueira, A.; **Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos. Comparação entre Método Colorimétrico e Titulométrico. Publicatio UEPG** – *Exact and Soil Sciences, Agrarian Sciences and Engineering*, v. 8, n. 1, 65-78, 2002.

[52] Teixeira, R. T.; **Caracterização Dos Açúcares Redutores E Não Redutores Em Mosto Cervejeiro Com Adição De Pão De Trigo.** *UNESC- Trabalho de conclusão de curso***,** 2017**.**

[56] Bamforth, C. W.; **Nutritional Aspects Of Beer—A Review**. *Nutrition Research - Elsevier*, 227–237, 2002.

[57] Demiate, I. M.; Wosiaki, G.; Czelusniak, C.; Nogueira, A.; **Analysis Of Total And Reducing Sugar In Foods. A Comparative Study Between Colorimetric And Titration Tecniques.** *Exact And Soil Sciences, Agrarian S. And Engineering*, 65-78, 2002.

[58] Morgano, M. A.; Faria, C. G.; Ferrão, M. F.; Bragagnolo, N.; Ferreira, M. M. C.; **Determinação De Proteína Em Café Cru Por Espectroscopia Nir E Regressão Pls1**. *Ciênc. Tecnol. Aliment*, 25-31, 2005.

[58] Müller, A.; ***Cerveja!*** *Canoas: Ulbra*, 2002.

[59] Preedy, V. R.; ***Beer In Health And Disease Prevention***. *London: Academic Press*, 2011.