

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Avaliação por RMN de alta resolução da presença de
cereais não maltados na produção de cervejas”**

Rafael Rodrigues Esteves*

Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do título de MESTRE
EM QUÍMICA, área de concentração:
QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira
(Departamento de química – DQ – UFSCar)

* bolsista CAPES

**São Carlos – SP
2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rafael Rodrigues Esteves, realizada em 16/07/2020.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira (UFSCar)

Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro (UFSCar)

Prof. Dr. Stanislaw Bogusz Junior (IQSC/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Química.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha família, especialmente à minha mãe e ao meu pai pela importância em minha vida, pelo amor, apoio e pela alegria que sentem em todas as minhas conquistas.

Dedico esse trabalho aos meus amigos, tanto aos que estão perto quanto aos que estão longe.

Dedico esse trabalho aos que trabalham comigo no Laboratório de RMN, o lugar me acolheu nesses últimos anos.

Dedico esse trabalho aos companheiros que trabalham comigo em projetos externos ao laboratório, sendo eles o Gabriel Scatena, o Ivanor Faturi Filho e o Thiago Carelli.

Dedico esse trabalho, por fim, aos professores que me apresentaram a química na época do colégio e me guiaram para os meus primeiros passos nessa carreira, a Profa. Maria Aparecida Borges Pereira e o Prof. Francisco Chaves de Moraes Filho (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira pelo voto de confiança, pela paciência, incentivo, apoio, orientação, conhecimentos transmitidos, pela amizade, sugestões e críticas para o desenvolvimento, realização e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Tiago Venâncio pelo excelente suporte e apoio no dia a dia do laboratório e no desenvolvimento de projetos.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho por ter disponibilizado o LaBioMMi para realizarmos parte do desenvolvimento deste projeto, pela amizade e pelos momentos de motivação.

Aos companheiros do Laboratório de RMN da UFSCar: Carol, Flávio, Gabriela, Glenda, Luciana, Marília, Paula, Paulo, Roberta e Wellington pela colaboração e por proporcionarem um ambiente de trabalho maravilhoso.

Ao Me. Murilo D Abruzzo Paix que foi essencial no desenvolvimento e na execução da etapa de produção das cervejas.

A todos os professores e funcionários do DQ-UFSCar que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

As empresas que disponibilizaram insumos utilizados nesse trabalho, sendo elas a Rohbrau de Piracicaba, o Sanca Brew de São Carlos e a Refrigerante São Carlos.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil) pela bolsa concedida, por possibilitar a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
AQ	<i>Acquisition Time</i> - Tempo de Aquisição (denominação BrukerBiospin [®])
ATMA	<i>Automatic Tunning and Matching</i> - <i>Tunning e Matching</i> Automático
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
COSY	<i>CORrelation SpectroscopY</i> - Espectroscopia de correlação
D1	Tempo de espera entre cada aquisição (denominação BrukerBiospin [®])
DS	<i>Dummy Scan</i> – Promediação sem aquisição de dados.
EM	Espectrometria de Massas
FID	<i>Free Induction Decay</i> - Decaimento Livre por Indução
F1	Eixo vertical no espectro bidimensional (denominação BrukerBiospin [®]).
F2	Eixo horizontal no espectro bidimensional (denominação BrukerBiospin [®])
HMDB	<i>Human Metabolome DataBase</i> - Banco de Dados de Metaboloma Humano
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i> - Correlação Heteronuclear de Quantum Único
Hz	Hertz
LB	<i>Line broadening</i> - fator utilizado na multiplicação exponencial (denominação BrukerBiospin [®]).
LC1PNCWPS	Sequência de pulso com múltipla saturação de sinais e

	desacoplamento de ^1H com ^{13}C (denominação BrukerBiospin [®]).
NS	<i>Number of Scans</i> - Número de promediações (denominação BrukerBiospin [®]).
NOESYGPPR1D	Sequência de pulso noesy com gradiente de pulso e supressão do sinal da água (denominação BrukerBiospin [®]).
O1P	Centro da janela espectral em ppm.
P1	Tempo do pulso de 90° de rádio frequência
PC	<i>Principal Components</i> - Componentes principais
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> - Análise de Componentes Principais
ppm	Parte por milhão
RG	<i>Receiver gain</i> – ganho do receptor
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SI	<i>Data size</i> - Número de pontos utilizados no processamento (denominação BrukerBiospin [®]).
SW	<i>Spectral window</i> - Janela Espectral em ppm (denominação BrukerBiospin [®]).
T	Tesla
TD	<i>Time Domain</i> - Número de pontos utilizados na aquisição dos espectros (denominação BrukerBiospin [®]).
TMSP-d4	Trimetil-silil-propionato de sódio tetradeuterado.
ZG30	Sequência de pulso com apenas o pulso de 30° (denominação BrukerBiospin [®]).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Temperatura de gelatinização do amido dos grãos comumente utilizados na produção de cervejas. (Página 19)

Tabela 3.1 - Proporção percentual em massa de cereais utilizados nas produções das cervejas em escala de laboratório. (Página 28)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 – Gráfico do número de cervejarias registradas no Brasil de 1999 até 2019. (Página 3)

Figura 1.2 – Faixa de atuação ótima de temperatura e pH de algumas enzimas do malte. (Página 11)

Figura 1.3 – Modelo esquemático do processo de lavagem dos grãos em um equipamento genérico de produção de cerveja. (Página 12)

Figura 1.4 – Modelo esquemático da estruturação de amiloses e das amilopectinas. (Página 17)

Figura 3.1 – Modelo explicativo da sequência de pulso ZG30 (Denominação BrukerBiospin®). (Página 31)

Figura 3.2 – Modelo explicativo da sequência de pulso NOESYGPPR1D (denominação BrukerBiospin®). (Página 32)

Figura 3.3 – Modelo explicativo da sequência de pulso LC1PNCWPS (denominação BrukerBiospin®). (Página 33)

Figura 4.1 – Espectros de RMN de ^1H do mosto e da cerveja obtidos utilizando a sequência de pulso ZG30 no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D_2O . (Página 35)

Figura 4.2 – Espectro de RMN de ^1H do mosto obtido utilizando a sequência de pulso NOESYGPPR1D no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D_2O . (Página 36)

Figura 4.3 – Espectro de RMN de ^1H de cerveja obtido utilizando a sequência de pulso NOESYGPPR1D no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D_2O . (Página 37)

Figura 4.4 – Espectro de RMN de ^1H de cerveja obtido utilizando a sequência de pulso LC1PNCWPS no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D_2O . (Página 38)

Figura 4.5 – Comparação entre as expansões dos espectros de RMN de ^1H de cerveja obtidos utilizando a sequência de pulso NOESYGPPR1D no equipamento de RMN de 9,4 Tesla (D_2O) das amostras das produções 100% Malte, 45% Arroz e 45% Milho. (Página 39)

Figura 4.6 – Exemplificação da escolha dos *buckets* para montagem da *bucket table*. (Página 41)

Figura 4.7 – Gráfico de PCA das amostras de mosto produzidos exclusivamente com malte de cevada como fonte de amido. (Página 43)

Figura 4.8 – Gráfico de PCA das amostras de mosto das produções 3, 6 e 9. (Página 45)

Figura 4.9 – Gráfico de PCA das amostras da etapa de fervura do mosto das produções 3, 6 e 9. (Página 47)

Figura 4.10 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 55% malte de cevada e 45% de milho como fonte de amido. (Página 50)

Figura 4.11 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 100% de malte de cevada, 30% e 45% de adjuntos, utilizando uma região específica dos espectros de RMN de ^1H . (Página 52)

Figura 4.12 – Variação da quantidade de alanina nas cervejas produzidas com flocos de arroz, observada nos espectros de RMN de ^1H obtidos como a sequência de pulsos NOESYGPPR1D em D_2O . (Página 53)

Figura 4.13 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 100% malte de cevada, 30% e 45% de adjuntos como fonte de amido, utilizando o perfil dos espectros de RMN de ^1H . (Página 54)

Figura 4.14 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 100 % de malte de cevada, 15% de adjuntos, 30% de adjuntos e 45% de adjuntos como fonte de amido. (Página 56)

RESUMO

AVALIAÇÃO POR RMN DE ALTA RESOLUÇÃO DA PRESENÇA DE CEREAIS NÃO MALTADOS NA PRODUÇÃO DE CERVEJAS. As estatísticas mostram que a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo. Essa é produzida utilizando água, malte de cevada, lúpulo e levedura como ingredientes principais. O uso dos cereais não maltados na produção de cervejas é comum para diminuir o custo do produto, porém a quantidade usada não é declarada nos rótulos. Normalmente, os substitutos do malte de cevada na produção industrial são os subprodutos mais baratos do milho (*Zea mays*) e arroz (*Oryza sativa*). Para responder a pergunta se a RMN pode detectar o uso de diferentes cereais não maltados na produção de cerveja, foram produzidas nove cervejas com diferentes porcentagens de malte de cevada, milho e flocos de arroz. As amostras foram coletadas durante todas as etapas importantes da produção e fermentação. O método foi desenvolvido com preparo de amostras simples, sendo somente uma diluição da amostra em água deuterada para evitar erros associados à esta etapa. Os espectros de RMN de ^1H foram adquiridos em um equipamento 9.4 Tesla (400 MHz) Bruker[®], modelo AVANCE III, usando uma sonda BBI de 5 mm, com a sequência de pulso NOESYGPPR1D, os espectros foram adquiridos e processados no programa Topspin 3.5 pl.7. Para as análises quimiométricas (PCA) foi utilizado o programa AMIX[®] versão do pacote 3.9.3. Utilizando PCA nos espectros de RMN de ^1H foi possível discriminar os grupos das cervejas produzidas exclusivamente com malte de cevada das cervejas produzidas com 30% e 45% de cereais não maltados. Esta análise mostrou que os principais compostos e metabólitos responsáveis por essa discriminação foram o ácido succínico, $\alpha(1,4)$ -glucose, ácido pirúvico e alanina. Finalmente, é possível concluir que o emprego da espectroscopia RMN de ^1H aliada às análises quimiométricas foi capaz de discriminar a presença de adjuntos na produção de cervejas. Esses resultados demonstram a separação dos grupos de cervejas produzidas com diferentes quantidades de adjuntos. Embora os resultados ainda sejam iniciais, estes demonstram o potencial da técnica para a continuidade desse estudo e de outros trabalhos que utilizem a RMN aplicadas em alimentos e bebidas.

ABSTRACT

STUDY OF THE IMPACT OF USING NO MALTED CEREALS ON BEER PRODUCTION ACCOMPANIED BY HIGH RESOLUTION NMR. Statistics show that beer is the most widely consumed alcoholic beverage in the world and it is made up of water, barley malt, hops and yeast as main ingredients. The use of non-malted cereals in beer production is common to reduce the production cost, however the amount used is not declared in the labels. Typically in industrial production, barley malt substitutes are the cheaper sub products from corn (*Zea mays*) and rice (*Oryza sativa*). To know about the capability of NMR on detection of different non-malted cereals in beer production, nine beers were produced with different percentages of barley malt, corn grains and rice flakes. The samples were collected during all important stages of production and fermentation. The method was developed with easily preparation of samples, just being a dilution of the sample in deuterated water to avoid errors associated with this step. The ^1H RMN spectra were acquired in a 9.4 Tesla (400 MHz) Bruker® equipment, model AVANCE III, using a 5 mm BBI probe, with the pulse sequence NOESYGPPR1D, being acquired and processed in the Topspin 3.5 pl.7 software. For the chemometric analysis (PCA) was used the AMIX® software version of the 3.9.3 package. Using PCA in the ^1H NMR spectra, it was possible to discriminate the groups of beers produced exclusively with barley malt from beers produced with 30% and 45% non-malted cereals. This analysis showed that the main compounds and metabolites responsible for this discrimination were succinic acid, $\alpha(1,4)$ -glucose, pyruvic acid, and alanine. Finally, it is possible to conclude that the use of ^1H NMR spectroscopy combined with chemometric analyzes were able to discriminate with high precision the presence of non-malted cereals in beer production. These results demonstrate the separation of groups of beers produced with different amounts of adjuncts. Although the results are still initial, they demonstrate the technique's potential for continuing this study and other work that uses NMR applied to food and beverages.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	III
AGRADECIMENTOS	IVV
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IXX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
SUMÁRIO	XIII
1. INTRODUÇÃO	2
1.1.CERVEJA	2
1.2 MATÉRIAS-PRIMAS NECESSÁRIAS PARA A PRODUÇÃO DE CERVEJA.	4
1.2.1. ÁGUA	5
1.2.2. MALTE	6
1.2.3. LÚPULO	7
1.2.4. LEVEDURAS	8
1.2.5. ADJUNTOS	8
1.3 PROCESSO PRODUTIVO	9
1.3.1 O USO DE ADJUNTOS NO PROCESSO PRODUTIVO	166

<u>1.4. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR APLICADA À ALIMENTOS</u>	20
<u>1.5. QUIMIOMETRIA</u>	222
<u>2. OBJETIVOS</u>	255
<u>3. MATERIAIS E MÉTODOS</u>	277
<u>3.1. PRODUÇÃO DAS CERVEJAS E COLETA DOS PONTOS</u>	277
<u>3.2. PREPARO DAS AMOSTRAS</u>	300
<u>3.3. OBTENÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹H.</u>	300
<u>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	355
<u>4.1. ANÁLISES PRELIMINARES DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹H</u>	355
<u>4.2. ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DAS AMOSTRAS DE MOSTO.</u>	400
<u>4.3. ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DAS AMOSTRAS DA FERVURA DO MOSTO.</u>	466
<u>4.4. ANÁLISE QUIMIOMÉTRICA DAS AMOSTRAS DE CERVEJA.</u>	48
<u>5. CONCLUSÕES.</u>	58
<u>5.1 PROPOSTA DE TRABALHO FUTUROS</u>	58
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</u>	59

CAPÍTULO 1

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cerveja

A cerveja é o produto resultante da via fermentativa das leveduras que atuam sobre o mosto cervejeiro, obtido a partir da cocção de malte de cevada e da infusão de lúpulo. Este processo também pode ser realizado utilizando adjuntos durante a produção do mosto. A substituição do malte de cevada por adjuntos, que são outras fontes de amido, é realizada principalmente para diminuir os custos de produção¹.

O Brasil, assim como a maioria dos países produtores de cerveja, permite e estabelece limites para o uso de adjuntos que substituem o malte de cevada na produção de cerveja. De acordo com a lei nº 8.918 (4 de julho de 1994), o decreto nº 9.902 (8 julho de 2019) e a instrução normativa nº 65 (dezembro de 2019) ficou estabelecido que a substituição do malte por adjuntos pode ser feita em até 45% em peso^{1,2}.

A cerveja é um produto popularmente conhecido e altamente consumido, sendo que os primeiros relatos de sua produção foram realizados há mais de 5 mil anos. A cerveja é a bebida alcoólica mais consumida no mundo, representando um setor econômico relevante e que precisa continuar evoluindo tecnologicamente³.

Segundo LARANJEIRA *et al.* (2010), no Brasil, a cerveja é a bebida alcoólica mais consumida⁴ e isto também pode ser observado a partir da considerável produção e consumo que também faz do Brasil o terceiro maior produtor e consumidor de cerveja do mundo. Em 2016, no Brasil foram produzidos 14,0 bilhões de litros, sendo que essa produção só foi menor que a produção da China (46,0 bilhões de litros) e dos EUA (22,1 bilhões de litros)⁵. Apesar da alta produção e consumo total, a média de consumo de cerveja per capita brasileira é de 68 litros/ano, que é menor que em países como a Alemanha, a República Tcheca e a Irlanda, que tem suas médias de consumo per capita acima de 80 litros/ano⁶.

Os números que justificam a importância deste setor não se restringem somente a produção e ao consumo, mas também aos setores periféricos. No Brasil estima-se que o setor cervejeiro tenha 117 mil hectares plantados com cereais destinados a produção de cerveja, gerando 2,2 milhões de empregos e R\$ 23 bilhões

em impostos por ano. Desta maneira, o montante gerado pela indústria da cerveja brasileira corresponde a 1,6% do Produto Interno Bruto (PIB)⁷.

Na última década é notável o crescimento do número de cervejarias registradas no Brasil. Em 1999 existiam 33 cervejarias registradas no país, enquanto no final de 2019 o total de cervejarias registradas no Brasil chegou a 1209 (Figura 1.1), com um total de 27.329 produtos registrados⁸. É provável que nos próximos anos esse número continue aumentando até chegar em um patamar onde ele se estabilize. Os dois estados que concentram a maior parte destas cervejarias são São Paulo e o Rio Grande do Sul (primeiro e segundo lugar respectivamente), totalizando 39% das cervejarias do país.



Figura 1.1 – Gráfico do número de cervejarias registradas no Brasil de 1999 até 2019. Figura adaptada⁸.

Apesar da diversidade de estilos de cervejas existentes, o grande montante da produção de cerveja no Brasil e no mundo está voltado para as cervejas do estilo *american standard lager*, popularmente rotulado como tipo Pilsen. Este estilo é marcado sensorialmente por ser uma cerveja leve, clara, refrescante e com baixo teor alcoólico (3 a 5%)⁹.

Os estilos de cervejas são separados inicialmente em dois grandes grupos que posteriormente são subdivididos em grupos menores. Esses dois grandes grupos separam as cervejas de baixa fermentação (*Lager* ou *bottom fermentation*) das cervejas de alta fermentação (*Ale* ou *top fermentation*). Essa distinção se deve, principalmente, ao processo fermentativo. Existem diferenças sutis entre o processo de produção de cada uma, mas aqui será abordado o contexto de uma maneira geral.

No processo produtivo das cervejas de baixa fermentação, o processo fermentativo é mais longo e é realizado em temperaturas mais baixas, na faixa de 10 °C. As cervejas deste grupo costumam ter sabores e aromas suaves. Desta classe, são algumas representantes: Pilsner, Munique Helles, Schwarzbier e Bock.

O outro grupo é o das cervejas de alta fermentação, sendo que neste caso a fermentação é realizada durante um período menor e em temperaturas mais elevadas, na faixa de 15 °C a 22 °C. Essas cervejas costumam apresentar mais aroma e sabor e são representadas pelos estilos Weizenbier, Lambic, Tripel e Indian Pale Ale (IPA)¹⁰. Essa classificação é amplamente aceita e usada segundo o Brewers Association (BA)¹¹ e o Beer Judge Certification Program (BJCP)¹², os quais redigem guias que atualmente descrevem mais de 140 estilos de cerveja.

1.2 Matérias-primas necessárias para a produção de cerveja.

Para produção de cerveja são necessárias quatro Matérias-primas: água, malte de cevada, lúpulo e fermento. Estas Matérias-primas são importantes para a produção e para manter as características do produto conhecido como cerveja. Nos próximos tópicos será abordada cada uma das Matérias-primas.

1.2.1. Água

O Componente majoritário na cerveja é a água. No passado acreditava-se que uma boa cerveja só poderia ser produzida a partir de uma água de boa qualidade. Em um determinado momento, essa afirmação era verdadeira devido às limitações tecnológicas da época. Atualmente, essa afirmação não é verdadeira, pois existe conhecimento e tecnologia suficientes para tratar a água que é utilizada na produção da cerveja. Deste modo, com os equipamentos e insumos necessários, pode-se tratar a água da maioria dos locais para produzir cerveja adequadamente.

Atualmente é comum o uso da filtração ou osmose reversa para retirar a maioria dos íons da água e posteriormente padronizá-la para a produção cervejeira. Por esse motivo, dizer que para fazer uma boa cerveja é necessária uma boa fonte de água, não é verdade. No passado, por não existir o conhecimento e as técnicas necessárias, se a natureza não contribuísse para que a cervejaria tivesse uma boa água, não se fazia boa cerveja¹³.

O primeiro ponto que deve ser considerado na produção das cervejas é que alguns estilos de cerveja devem ser produzidos com uma água que tenha uma determinada proporção de íons, que definem determinados “tipos” de água. Esses íons presentes na água são cloreto, sulfato, cálcio e magnésio, que são ajustados pela adição dos sais, como o sulfato de cálcio. No produto final, estes íons influenciam no perfil sensorial da cerveja. Desta maneira, para produzir determinadas cervejas, deve-se utilizar o perfil de íons mais próximo ao padrão original de cada estilo.

No caso da cerveja Pilsen, a água para a sua produção deve ter uma concentração muito baixa de íons frente aos outros estilos, esse é um dos fatores que faz dela uma cerveja leve e com sabor e aroma neutro¹³.

1.2.2. Malte

Malte é o nome dado ao cereal que passou pelo processo de malteação e, majoritariamente, se produz o malte de cevada (*Hordeum vulgare*), fato tão enraizado culturalmente que quando o malte é produzido com outro cereal, este recebe o nome do cereal como sufixo, por exemplo, malte de trigo¹⁴. Desta forma, neste texto, o termo “malte” se refere exclusivamente ao malte de cevada.

O processo de malteação é o processo de germinação interrompido. Os grãos de cevada são colhidos nas plantações e são levados para a maltaria, onde são limpos, umidificados e colocados em grandes recipientes com controle de temperatura e umidade onde começarão a germinar.

Durante a germinação, o embrião do grão começa a produzir as enzimas, α -amilase e β -amilase, que são necessárias para converter o amido do grão em açúcar que ele próprio irá consumir para multiplicar suas células e crescer. Neste momento, o embrião se desenvolve e a radícula cresce no grão. Após esta etapa é realizado o processo de secagem, em que o teor de umidade é reduzido para a faixa de 4% e o crescimento é interrompido. Realiza-se o processo de retirada da radícula e a partir deste ponto o malte está pronto para o ser usado, e passa a ser o grão que contém as enzimas necessárias para a produção de cerveja. Alguns maltes passam por processos de torra e/ou caramelização, gerando características sensoriais especiais e quando são usados para a produção de cervejas agregam essas características no produto final¹⁴.

Resumindo a função do malte, pode-se dizer que ele é a fonte de amido que contém as enzimas que transformam o próprio amido em açúcares fermentescíveis, além de conter aminoácidos, proteínas e outros compostos que serão importantíssimos para a qualidade da cerveja.

1.2.3. Lúpulo

O lúpulo, *Humulus lupulus*, é uma planta da família *Cannabaceae*. O uso da flor do lúpulo para a produção de cerveja é relatado desde o século IX e antes desse período utilizava-se um conjunto de ervas denominado “gruit” durante a produção. Também existem relatos de diversos outros conservantes naturais utilizados para a produção de cervejas, como por exemplo, o gengibre. Porém, em determinado momento o lúpulo ganhou destaque e no ano de 1516 ele era oficialmente um dos três ingredientes para a produção de cervejas segundo a lei *Reinheitsgebot* (Lei da Pureza – tradução livre) da Baviera¹⁵.

O lúpulo possui características químicas que fazem da sua flor um ingrediente excelente para a produção de cervejas. A flor de lúpulo possui, α -ácidos, β -ácidos, óleos essenciais, flavonoides e outros compostos capazes de conferir, aroma, sabor e propriedades antibacterianas para a cerveja¹⁶.

Atualmente, no Brasil, o lúpulo é majoritariamente comercializado na forma de *pellet* e não na forma de flor. Isso é importante para a parte produtiva, pois diminui a carga vegetal durante a etapa de fervura do mosto. Durante o processo produtivo, o lúpulo é usado na etapa de fervura, momento em que os seus α -ácidos são isomerizados em iso- α -ácidos. Estes compostos são os principais responsáveis pelo amargor das cervejas¹⁷.

Existem centenas de variedades de lúpulos e a região do plantio, faz com que a sua flor tenha aromas e sabores variados, (cítrico, terroso, picante, herbal, floral, entre outros). Desta maneira o lúpulo abre um leque de possibilidades na produção de cervejas, e essas características contribuem na definição do estilo de cada cerveja.

1.2.4. Leveduras

Leveduras são organismos unicelulares pertencentes ao reino dos fungos. Existem mais de 500 espécies de leveduras, as quais pertencem ao gênero *Saccharomyces*, majoritariamente. Na produção de cervejas, existem duas espécies predominantes: a *Saccharomyces cerevisiae*, que é a espécie utilizada na maioria das cervejas de alta fermentação (*Ale*) e a *Saccharomyces pastorianus*, que é a espécie utilizada na maioria das cervejas de baixa fermentação (*Lager*)¹⁸. Além da diferença de espécies, existem também as diferentes linhagens que são desenvolvidas por cada produtor de leveduras. Essa variedade de leveduras disponíveis no mercado ajuda no desenvolvimento de cerveja com diferentes características.

As leveduras têm um papel essencial na produção das cervejas. Parte do processo de produção de cerveja consiste na preparação do mosto para que a levedura o transforme em cerveja. Resumidamente, a levedura metaboliza o açúcar do mosto gerando principalmente etanol e CO₂, além de gerar compostos minoritários que são responsáveis pelo sabor e aroma da cerveja. Quando a levedura metaboliza o açúcar do mosto, ela produz energia que é utilizada para formar novas células de levedura que irão continuar o processo de fermentação¹⁸.

1.2.5. Adjuntos

Adjuntos são produtos de origem vegetal ou animal que são utilizados na produção de cerveja. Genericamente, é qualquer matéria prima utilizada na produção de cerveja que não seja água, malte, lúpulo e levedura¹.

Existem duas motivações principais para o uso de adjuntos na produção de cervejas. Uma delas tem o objetivo de conferir alguma característica especial à cerveja, por exemplo, o uso de mel para agregar sabor ou aroma. A outra motivação é uso de adjuntos como fonte de amido alternativa, que são utilizados no lugar do malte de cevada para tornar o produto final menos oneroso.

No Brasil, de acordo com a Instrução normativa nº 65 (10 de dezembro de 2019), adjuntos cervejeiros são as matérias-primas que substituam, em até 45% em

peso em relação ao extrato primitivo, o malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro¹.

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho¹⁹ e de arroz²⁰, por esse motivo essas fontes de amido são comumente utilizadas para a produção de cervejas. Quando os grãos são usados na produção, normalmente utiliza-se os *gritz* de milho ou quirera de arroz (grão quebrado) pois possuem menor valor comercial.

1.3 Processo produtivo

A produção de cervejas é um processo longo e delicado. Existem diversos livros que detalham e descrevem esse processo. O conteúdo descrito neste tópico do trabalho tem como base o livro, de produção nacional, “Tecnologia Cervejeira” desenvolvido pelo SENAI¹⁴ e pela maltaria agrária e a série dos livros estrangeiros do Jonh Palmer^{13, 17} como o “*How to brew*” e o “*Designing Great Beers*” do Ray Daniels²¹.

Um dos fatores que variam consideravelmente na produção de cervejas é o tempo de fermentação e maturação. Existem cervejas que são produzidas rapidamente, levando em média 14 dias de produção, por outro lado existem processos produtivos que podem durar até mais de um ano considerando o processo de envelhecimento da cerveja. De maneira geral, o processo como um todo é dividido em duas etapas: a quente e a fria.

A etapa quente que é também conhecida como brassagem ou mostura e tem duração de aproximadamente 8 horas. Ela é subdividida em outras etapas como: cozimento e sacarificação do mosto; filtragem (ou clarificação do mosto); lavagem dos grãos; desnaturação das enzimas; fervura do mosto; *whirlpool*; resfriamento do mosto e a transferência do mosto para o tanque fermentador. Nessas etapas são consumidas três Matérias-primas: água, malte e lúpulo. O uso da quarta matéria prima, o fermento, marca o início da etapa fria nas produções de cerveja.

A etapa fria das produções de cerveja tem o seu início na inoculação do fermento no mosto, sendo também subdividida em outras etapas: fermentação;

descanso do diacetil; maturação; decantação; filtração; carbonatação e o envase. Ao fim de todos esses processos, a cerveja está pronta para o consumo.

O processo de produção das cervejas tem início na moagem do malte, realizado utilizando moinhos de rolo. Existem vários modelos e marcas de moinhos, mas todos eles têm a mesma função: quebrar a casca do malte e moer a parte interna do grão. A casca deve apenas ser rompida, isso porque, na maneira tradicional de produção de cerveja, a casca é de suma importância para compor o elemento filtrante do mosto na etapa da sua filtragem. A parte interior do grão deve ser quebrada em duas ou três partes, quanto menor for o tamanho da partícula resultante da moagem, maior será seu contato com a água durante o cozimento do mosto e melhor será o rendimento da produção. O limite da moagem do interior do grão é o menor tamanho que ainda possibilite uma boa filtração.

Após a moagem do malte, inicia-se o aquecimento da água que será utilizada na produção da cerveja. Quando a água estiver a 40 °C, ela é adicionada ao malte em uma proporção de aproximadamente 3,0 l de água para cada Kg de malte, assim se inicia a etapa quente da produção. Durante o cozimento do malte, podem-se estabelecer várias temperaturas de cozimento por tempos específicos, também conhecidos popularmente como rampas. Esses patamares de temperatura são as temperaturas ótimas para a ação das enzimas presentes no malte.

Durante o cozimento, os patamares de temperatura favorecem enzimas específicas para atuar sob o substrato, essas enzimas atuam principalmente na transformação das proteínas em amino ácidos e do amido em açúcares. Por exemplo, a aminopeptidase tem temperatura ótima de ação a 45 °C, a β -amilase na faixa de 60 °C à 65 °C e a α -amilase na faixa de 70 à 75 °C. O termo sacarificação refere-se à temperatura de atuação da α -amilase e β -amilase. Na Figura 1.2, pode-se visualizar a faixa de temperatura e pH ideais para a atuação de algumas das enzimas do malte.

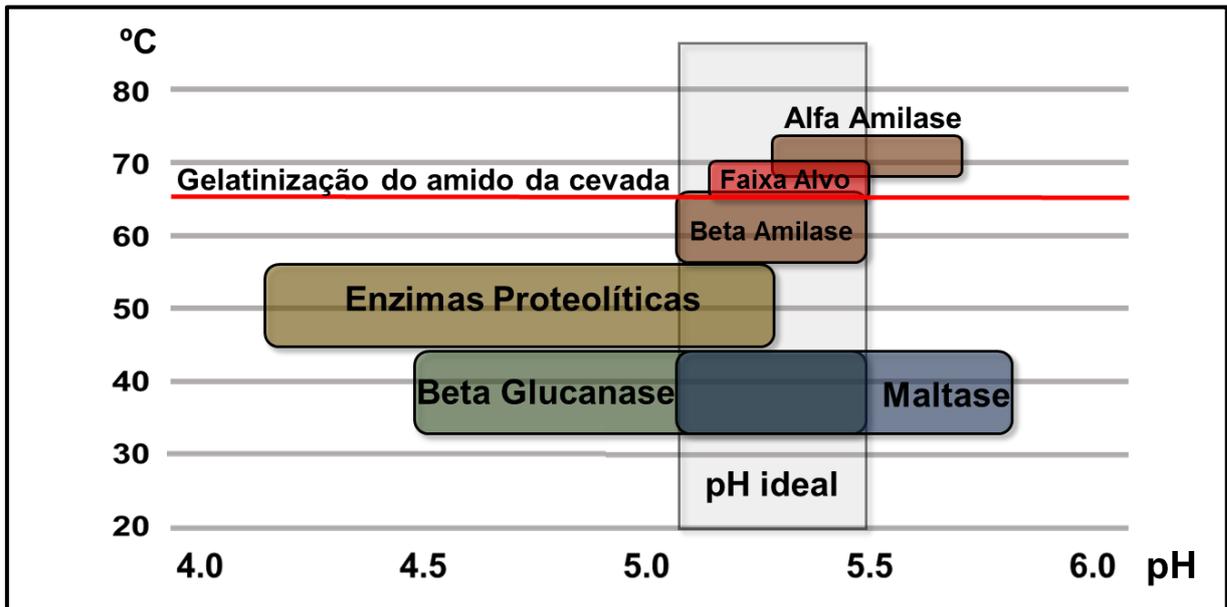


Figura 1.2 – Faixa de atuação ótima de temperatura e pH de algumas enzimas presentes no malte¹⁴ (Figura adaptada).

Em uma cervejaria o mestre cervejeiro define as rampas que serão feitas durante a produção, sendo que muitas delas são comuns entre vários tipos de cerveja. Por exemplo, a rampa da β -amilase é responsável por otimizar a atuação destas enzimas que quebram as cadeias do amido formando os açúcares que serão consumidos pela levedura gerando o álcool que estará presente na cerveja.

Existem rampas específicas para a produção de algumas cervejas, como acontece com as cervejas de trigo do estilo alemão. Na presença de malte de trigo, é realizado um patamar de temperatura a 43° C, sendo que nessa temperatura as glucanases transformam o substrato no ácido ferúlico. Durante a fermentação das cervejas de trigo, a levedura transforma o ácido ferúlico no 4-Vinil-guaiacol que é o composto fenólico responsável pelo aroma de cravo, típico das cervejas de trigo²².

O último patamar de temperatura realizado durante o processo de brassagem é à 78° C, sendo que nessa temperatura as enzimas são desnaturadas e tornam-se inativas. Esse processo finaliza a etapa de cozimento do malte e a próxima etapa é o processo de filtragem ou clarificação do mosto.

No processo de clarificação, o mosto é bombeado para circular do fundo da tina de clarificação para o topo da tina, desta maneira o líquido é forçado a atravessar a

camada de malte diversas vezes. Neste processo a casca do malte torna-se o elemento filtrante que está sobre um fundo falso que possui pequenos furos ou ranhuras que permitem a passagem do mosto, mas que retém o malte. Neste processo enquanto o líquido atravessar a massa de malte, as partículas que tornam o mosto turvo ficam retidas na camada de malte e a continuidade desse processo torna o mosto mais cristalino.

Após a finalização do processo de clarificação do mosto primário inicia-se a transferência do mesmo para a tina de fervura, enquanto isso, na tina de clarificação onde está a massa de malte, inicia-se o processo de lavagem dos grãos. Este processo consiste em recircular água a 80 °C pela massa de malte. Nessa etapa os açúcares residuais são extraídos desta massa, gerando o mosto secundário, que posteriormente é transferido para a tina de fervura onde se juntará ao mosto primário. Estes processos ajudam a melhorar o rendimento da produção (Figura 1.3).

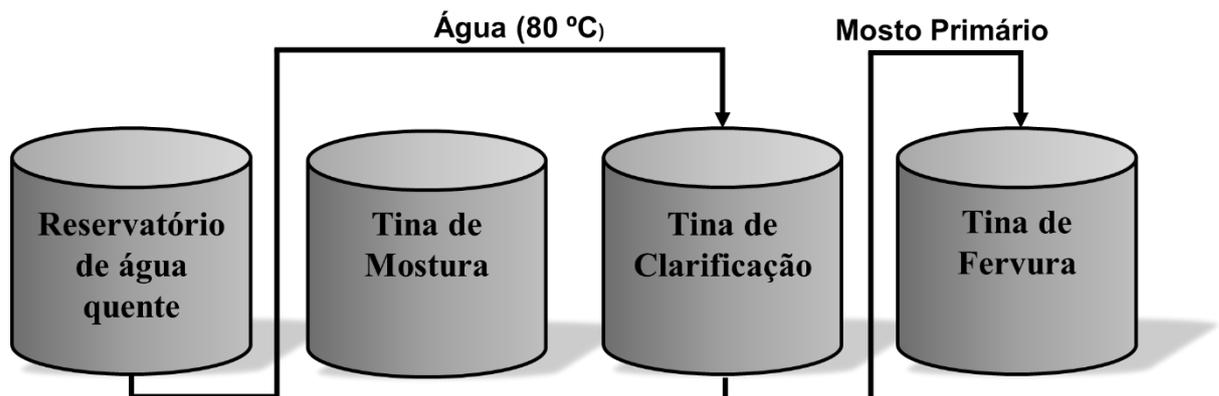


Figura 1.3 – Modelo esquemático do processo de lavagem dos grãos em um equipamento genérico de produção de cerveja.

Após a lavagem dos grãos, quando todo o mostro primário e secundário estiverem na tina de fervura, o processo de fervura é iniciado. Esse processo tem grande importância na produção de cervejas, pois nele ocorre a adição dos lúpulos que contribuem para o aroma, sabor e amargor da cerveja, além de garantir a eliminação dos microrganismos, a perda de água e a volatilização de componentes indesejáveis como o dimetilsulfeto (DMS). O processo de fervura é realizado,

normalmente, durante uma hora, contando a partir do momento em que o mosto começa a ferver.

Durante a fervura, os α -ácidos presentes no lúpulo são isomerizados em iso- α -ácidos e essas são as principais substâncias responsáveis pelo sabor amargo das cervejas. Durante este processo deve-se promover uma fervura vigorosa do mosto, porque além do processo de isomerização e extração dos óleos essenciais do lúpulo, também é necessário promover a volatilização de compostos indesejáveis como o dimetilsulfeto (DMS). O DMS é um composto orgânico que acima de 0,15 mg/L na cerveja é considerado como um defeito, ou um *off-flavor*, e sua presença na cerveja é associada ao cheiro de vegetal cozido.

Quando o processo de fervura é finalizado, inicia-se o processo conhecido como *whirlpool* e posteriormente a refrigeração do mosto. O *whirlpool* é o processo em que o mosto é movimentado gerando um vórtex no meio da tina, esse movimento auxilia a decantação dos resíduos do malte e do lúpulo no fundo da tina. Após esta decantação, o mosto é separado do corpo de fundo, resfriado e enviado para o fermentador.

A etapa de resfriamento é necessária para que a levedura seja inoculada no mosto na temperatura adequada, para realizar esse procedimento são utilizados trocadores de calor. Na maioria dos equipamentos, são utilizados trocadores de calor, de placas, onde de um lado circula o mosto quente e do outro circula um líquido refrigerante. Na etapa de resfriamento deve ser feita rapidamente, pois é necessário diminuir a temperatura para um patamar abaixo de 60 °C em menos de 15 minutos, garantindo que não ocorra mais conversão dos α -ácido e que não será perdido parte do aroma do lúpulo.

Como o processo de resfriamento é realizado o bombeando o mosto através dos trocadores de calor, ele acontece simultaneamente ao processo de transferência para o tanque fermentador.

Após o mosto ser transferido para o tanque fermentador e estando na temperatura ideal para a fermentação, é realizada a oxigenação do mosto. Basicamente, o processo de oxigenação é realizado conectando um cilindro de O₂ diretamente na entrada inferior do tanque e liberando o gás para ser difundido no mosto. Durante a difusão do oxigênio através do mosto parte dele é dissolvido no

líquido. Em alguns equipamentos os processos de resfriamento, transferência e oxigenação são realizados concomitantemente em linha de produção.

A oxigenação é um processo rápido, simples e importante durante a produção de cervejas, pois sua falta pode gerar problemas no produto final. A cerveja é uma bebida fermentada, porém, no início da fermentação as leveduras utilizam a respiração aeróbica pela via metabólica da glicólise e do ácido cítrico (ciclo de Krebs) para gerar energia, crescer e se reproduzir. Rapidamente elas consomem o oxigênio do ambiente (mosto) e passam a usar a via da fermentação alcoólica para realizar a respiração anaeróbica para obter energia²³.

Assim que o mosto se encontra no tanque fermentador, na temperatura adequada para o processo fermentativo e oxigenado, faz-se a inoculação do fermento. Neste momento a etapa quente da produção é finalizada e se inicia a parte fria da produção de cerveja, a fase fermentativa.

Durante a fermentação, as leveduras crescem, se multiplicam, consomem todo o oxigênio do meio, além de consumirem quase todos os açúcares e aminoácidos, produzindo CO₂ e etanol, além de uma série de outras substâncias. Em média, nas cervejas de alta fermentação este processo ocorre em 4 dias, enquanto que em cervejas de baixa fermentação ele ocorre em 7 dias.

Na fase fermentativa a levedura produz a substância 2,3-butanodiona conhecida como diacetil. Este composto quando presente na cerveja pronta, remete ao aroma de manteiga. Este *off-flavor* é encontrado em cervejas produzidas onde o período de fermentação foi encurtado, pois durante o final da fase fermentativa, ainda com atividade das leveduras, deve-se elevar a temperatura do tanque em aproximadamente 2° C para que a levedura continue ativa e consuma o diacetil. Essa etapa é conhecida como descanso do diacetil e tem duração média de 2 dias.

Após o descanso de diacetil deve-se realizar a maturação da cerveja. O tempo dessa etapa varia dependendo do estilo da cerveja que está sendo produzida. Comumente a maturação é responsável pela finalização da cerveja. Entende-se que este é o tempo necessário para que a cerveja se aproxime do seu melhor sabor e aroma. Normalmente a temperatura de maturação é cerca de 5 °C abaixo da temperatura de fermentação, tendo pouca atividade das leveduras de maneira que existe uma pequena mudança do perfil químico da cerveja. Para cervejas de alta

fermentação, 7 dias de maturação é aceitável, enquanto que para as cervejas de baixa fermentação são necessários cerca de 14 dias.

A decantação da cerveja é um dos processos finais da produção, sendo realizado através da redução da temperatura do tanque fermentador para que a levedura termine de flocular e decante juntamente com os restos de lúpulo e outros componentes indesejáveis no produto final. A decantação pode ser substituída totalmente ou parcialmente pela filtração da cerveja, que pode ser feita em diversos filtros, como os filtros de terra de diatomácea. Existem também, centrifugas de cerveja que são usadas para os mesmos fins. Esses processos não são obrigatórios, mas verifica-se que os consumidores finais têm apreço por cervejas cristalinas, pois poucos estilos de cervejas turvas tornaram-se populares.

A carbonatação, ou gaseificação das cervejas é o processo onde ocorre a dissolução do gás carbônico, CO₂, na cerveja. Esse processo pode ser feito de duas maneiras, a primeira é a forma natural, conhecida como refermentação e a segunda é a maneira mais rápida, conhecida como carbonatação forçada.

Na indústria também é possível aproveitar o próprio CO₂ produzido pela levedura durante a fermentação para carbonatar a cerveja. Apesar do uso do próprio gás gerado pela levedura parecer viável, usá-lo no processo não é simples. Isso porque na etapa em que a levedura produz o CO₂ também são produzidos outros compostos que são indesejados no produto final. Então, caso seja decidido reter o gás carbônico produzido pela fermentação para gaseificar a bebida presente no tanque, é possível que alguns compostos indesejados também sejam retidos.

No processo de carbonatação forçada, o gás sob pressão é conectado ao tanque maturador e nesta conexão encontra-se uma pedra difusora. Essa é uma peça cilíndrica de inox com poros de 0,5 a 2,0 micrometros que fazem com que o gás se difunda e dissolva rapidamente na cerveja. A verificação da quantidade de gás na cerveja é realizada avaliando a pressão do tanque ao longo de alguns dias.

O outro processo que pode ser realizado é a refermentação, onde nesse processo adiciona-se uma fonte de açúcar na cerveja. Comumente, são adicionados 5 g de açúcar por litro de cerveja, sendo que essa quantidade de açúcar é o suficiente para reativar as leveduras que irão transformar esse açúcar em etanol e gás carbônico e posteriormente voltarão ao seu estado de dormência.

A refermentação é a maneira mais simples de carbonatar a cerveja do ponto de vista dos produtores caseiros, pois normalmente estes não possuem equipamentos minimamente sofisticados para fazê-la de outra maneira. O processo leva cerca de 7 dias e é necessário manter a cerveja na mesma temperatura em que ela foi fermentada, gerando turbidez na cerveja por conta do crescimento das leveduras e tornando difícil o ajuste fino deste processo. Por esses motivos, industrialmente, ele é inviável e pouquíssimas cervejarias no mundo usam esse processo.

Após o processo de carbonatação da cerveja, ela está definitivamente pronta para o consumo. Deste ponto em diante se decide a forma na qual a cerveja será envasada e para isso existem duas maneiras comuns, que são o barril de chope e a garrafa de cerveja.

O processo de pasteurização é importante para as cervejas que vão para o mercado e que passarão por um longo tempo de prateleira sem refrigeração. Louis Pasteur, desenvolveu um processo que hoje é conhecido como pasteurização e que consiste no aquecimento de um produto (leite, cerveja e outros) acima de 57° C por alguns minutos ou à temperaturas próximas à 72 °C por alguns segundos, seguido de um resfriamento rápido. Esse aquecimento é suficiente para eliminar a maioria dos microrganismos capazes de degradar os produtos, desta maneira eles passam a ter uma validade maior. Um produto mais estável, com uma validade maior, pode ser vendido em locais mais distantes e pode passar mais tempo nas prateleiras, gerando facilidade para produtores, distribuidores, vendedores e consumidores²⁴.

1.3.1 O uso de adjuntos no processo produtivo

No tópico anterior foi abordado todo o processo produtivo de uma cerveja genérica. Porém, não foi abordado como é feito o uso de adjuntos, que são fontes de amido alternativas na produção do mosto, como por exemplo sub produtos do milho e arroz.

O principal grão, e fonte de amido, utilizado na produção de cerveja é o malte de cevada. A conversão do amido em açúcar na produção do mosto é um processo que ocorre via enzimática, e dentro de um limite a cinética da reação não depende da quantidade de enzimas presentes na solução. Desta maneira, a substituição de parte

do malte por cereais não maltados no processo produtivo é possível, partindo do pressuposto que uma determinada quantidade de malte já possui a quantidade necessária de enzimas para a conversão do amido em açúcares.

O amido é formado por dois tipos de polissacarídeos, as amiloses e as amilopectinas (Figura 1.4). Estas duas classes de compostos são formadas por unidades de glicose. Nas amiloses as ligações glicosídicas α -1-4 formam uma cadeia linear que resulta em uma estrutura terciária helicoidal das amiloses. Enquanto nas amilopectinas, as unidades, formam ligações α -1-6, resultando em ramificações da estrutura das amilopectinas. Na constituição da estrutura do amido existe uma quantidade de amilopectinas maior que amiloses²⁵.

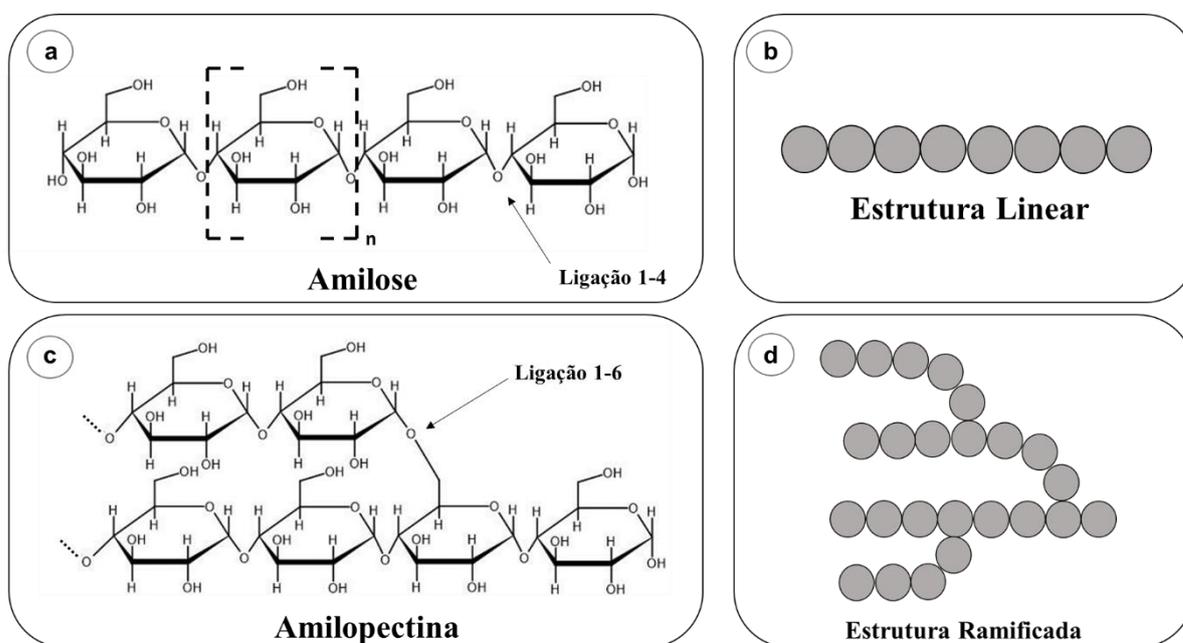


Figura 1.4 – Modelo esquemático da estruturação de amiloses e das amilopectinas. Em (a) encontra-se a estrutura química da amilose e a ilustração da ligação 1-4. Em (b) encontra-se a ilustração da amilose como um polissacarídeo com estrutura linear. Em (c) encontra-se a estrutura química da amilopectina e a ilustração da ligação 1-6. Em (d) encontra-se a ilustração da amilopectina como um polissacarídeo com estrutura ramificada.

O malte possui todo o conteúdo enzimático necessário para converter o amido disponível em açúcares. Destas enzimas, as β -amilases interagem com a ponta das cadeias das amiloses e das amilopectinas, quebrando a ligação glicosídica e formando um dissacarídeo, a maltose (duas moléculas de glicose). Por outro lado, a α -amilase é capaz de romper a cadeia de polissacarídeos em qualquer ponto, com exceção do ponto de ramificação das amilopectinas. Desta maneira a ação das amilases seria suficiente para transformar qualquer amido em açúcar. Porém, para garantir esta transformação é necessário que o amido esteja disponível, dissolvido na solução para que as enzimas possam atuar sobre ele.

Diversos grãos têm amido na sua composição e este é utilizado como reserva energética para o vegetal. O amido produzido por cada espécie de planta apresenta diferenças em sua estrutura final devido, principalmente, às proporções de amiloses e amilopectinas que influenciam nas propriedades físico-químicas do amido. Uma das propriedades que é influenciada e que é relevante para a produção de cervejas, é a temperatura de gelatinização²⁶.

A gelatinização é o processo em que os grânulos de amido são aquecidos em água até que ocorra a ruptura da estrutura granular, o inchamento, a hidratação e por fim, a solubilização do amido. Portanto, ao fim desse processo irreversível, o amido está dissolvido e disponível na solução²⁶.

A partir do momento que o amido é gelatinizado, ele se torna disponível para a ação das α -amilases e as β -amilases. A Tabela 1.1 mostra porque essa propriedade não interfere na produção de cerveja quando se utilizam os grãos cujo amido tem a temperatura de gelatinização até 65 °C com: centeio, cevada e trigo. Por outro lado, essa propriedade interfere em produções que utilizam grãos que possuem amido com temperatura de gelatinização acima de 65 °C. Nesses casos, as atividades das α -amilases e das β -amilases são pequenas ou até nulas quando o amido estiver disponível.

Tabela 1.1 - Temperatura de gelatinização do amido dos grãos comumente utilizados na produção de cervejas¹⁴. (Tabela ou quadro)

Grão	Temperatura de Gelatinização
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	82 °C
Centeio (<i>Secale cereale</i>)	61 °C
Cevada (<i>Hordeum vulgare</i>)	65 °C
Milho (<i>Zea mays</i>)	78 °C
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	75 °C
Trigo (<i>Triticum</i>)	60 °C

Para que seja possível utilizar grãos que possuam amido com temperatura de gelatinização acima de 65 °C na produção de cervejas, é necessário utilizar o cozedor de adjuntos. O cozedor de adjuntos é uma tina semelhante a uma tina de mostura, em que são adicionados o adjunto moído, água e uma parte da quantidade de malte total da produção (10 a 20 % em massa). A quantidade de água deve ser calculada de forma que esteja proporcional a quantidade de malte utilizado¹⁴.

Quando as Matérias-primas estiverem no cozedor de adjuntos, inicia-se o processo de aquecimento até a estabilização da temperatura no valor em que ocorre a gelatinização do amido do adjunto em uso. Essa temperatura deve ser mantida por 30 minutos, após este tempo eleva-se a temperatura até a fervura e essa é mantida por mais 30 minutos. Ao fim deste processo, o amido dos grãos encontra-se totalmente gelatinizado e deve ser transferido para a tina de mosturação. Recomenda-se realizar essa transferência no aquecimento do mosto para a rampa de sacarificação para aproveitar a temperatura do adjunto para o aquecimento.

Este processo descreve o uso de adjuntos na forma de grãos para a produção de cerveja. É possível utilizar adjuntos de outras duas formas, que são: os flocos e os extratos dos grãos. Nestes dois casos, o amido se encontra gelatinizado e não é necessário utilizar o cozedor de adjuntos. Quando se utiliza os flocos de grão, é possível adicioná-los na tina de mosturação juntamente com o malte e o processo é realizado normalmente. No caso do uso de extrato, este pode ser usado na mosturação ou na própria fervura, aproveitando temperaturas mais elevadas para facilitar a solubilização do extrato.

No Brasil, independentemente do modo de utilização dos adjuntos na produção de cervejas deve-se respeitar o limite de até 45 % em massa de adjuntos para que o produto seja considerado cerveja.

1.4. Ressonância Magnética Nuclear aplicada à alimentos

A ciência dos alimentos utiliza técnicas analíticas como medida de pH, viscosidade, densidade, índice de refração, dentre várias medidas físico-químicas para analisar os alimentos e bebidas, essas mediadas menos complexas são importantes devido a sua rapidez e disponibilidade. Porém atualmente existem outras técnicas mais complexas que têm capacidade de gerar dados relevantes para os estudos de alimentos. Dessas técnicas, destaca-se a ressonância magnética nuclear (RMN), que é uma técnica importante em análises de alimentos, sendo responsável por resultados de determinação de origem, adulteração e quantificação de substâncias.

A aplicação das análises de RMN em alimentos tem crescido continuamente. Suas primeiras aplicações no campo da ciência dos alimentos foram realizadas em meados de 1980. Desde então as análises de RMN vem ganhando espaço na ciência dos alimentos, seja nas análises de RMN de baixa resolução, alta resolução ou em análises por imagem. As vantagens apresentadas pela técnica são: alta seletividade, a capacidade de analisar substâncias tanto no estado líquido quanto sólido, alta reprodutibilidade das medidas e a facilidade do preparo das amostras²⁷.

Quando se compara a RMN às outras técnicas utilizadas nas análises de alimentos, nota-se que a RMN apresenta um limite de detecção mais elevado quando comparada às técnicas de espectrometria de massas (EM), a cromatografia líquida de alta resolução (CLAE-DAD) e a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). De uma forma geral, todas as técnicas citadas apresentam vantagens e limitações. Sendo que um dos focos deste trabalho é contribuir com a demonstração da potencialidade da espectroscopia de RMN como uma técnica útil nas ciências de alimentos e, em particular, nos estudos de bebidas alcoólicas.

Na ciência de alimentos um dos focos de estudo é a composição química, pois todo alimento é composto por diversas substâncias orgânicas como: proteínas, ácidos

graxos, carboidratos, aminoácidos, ésteres, álcoois, fenóis, entre outros. A identificação, caracterização e quantificação destas substâncias são pontos importantes no desenvolvimento deste campo científico, do qual a RMN tem capacidade de gerar dados relevantes.

Na literatura se encontram diversos trabalhos em que a RMN é utilizada como ferramenta analítica no estudo de alimentos. Nesses trabalhos são utilizadas diversas matrizes, tais como méis²⁸, vinhos²⁹, cervejas³⁰, leites³¹, queijos³², carnes³³, óleos vegetais³⁴, entre outros. Esses produtos têm, individualmente, um enorme impacto na economia e na sociedade e por esse motivo serão continuamente objetos de estudo.

Os estudos de alimentos utilizando RMN apresentam diversas abordagens, pois a RMN é uma técnica ampla e que gera resultados que podem apoiar estudos de compostos alvos, análise de perfil, razão isotópica, entre outros. Um exemplo de trabalho prático com foco em compostos alvo (*target compounds*) foi realizado analisando os sucos cítricos. Neste estudo de adulteração em suco de laranja pelo uso da água de lavagem do bagaço da laranja, a adulteração foi identificada através da presença da dimetilprolina nas amostras de suco concentrado. Essa substância está presente em maior quantidade no albedo do fruto e quando se incorpora a água de lavagem ao suco, ela é encontrada no produto final indicando o uso indevido desta água³⁵.

Por outro lado, existem trabalhos que utilizam as análises de perfil químico combinando os dados de RMN ao uso das análises quimiométricas como as PCA. DUARTE *et al.* (2002) utilizou a RMN no estudo da produção de cervejas, caracterizando as substâncias encontradas nas cervejas de alta e baixa fermentação utilizando as análises de RMN de ¹H e de ¹³C. Além disso, a aplicação das PCA na região aromática dos espectros de RMN de ¹H resultaram na separação entre os tipos e fermentação das cervejas³⁶.

Posteriormente LACHENMEIER *et al.* (2005) publicaram o uso da RMN de alta resolução no controle de qualidade de cervejas, após a análise de um conjunto de 76 amostras, entre as quais haviam cervejas de alta e baixa fermentação. Os pesquisadores aplicaram as PCA aos espectros de RMN de ¹H na região aromática (7,60 – 6,70 ppm no espectro de RMN de ¹H) e encontram resultados que visualmente separaram as cervejas produzidas com malte de trigo das produzidas com malte de

cevada. Porém nesta análise as cervejas de alta e baixa fermentação formaram um único grupo na PCA que se mostrou distinto das cervejas de trigo, indicando que a variação das Matérias-primas utilizadas na produção de alimentos são detectadas pela aplicação das análises de RMN aliada a quimiometria³⁷.

Em seguida ALMEIDA *et al.* (2006) utilizaram a RMN aliada a PCA no estudo de cervejas de baixa fermentação produzidas em três datas e em três locais diferentes, estudando a reprodutibilidade das produções dos locais A, B e C. Os resultados revelaram que o local A teve a melhor reprodutibilidade das produções quando comparado aos outros dois produtores. A PCA que mostrou a distinção entre as amostras dos locais de produção utilizou a região de 3,10 ppm a 0,50 ppm do espectro de RMN de ¹H e os sinais responsáveis pela separação foram atribuídos aos ácidos pirúvico e lático. Segundo os autores, os resultados levaram a conclusão que a RMN aliada a PCA é um bom método para o estudo do padrão de qualidade das cervejas³⁰.

Os resultados apresentados pelos trabalhos citados previamente destacam como as análises do perfil químico via RMN costumam estar aliadas as análises quimiométricas em trabalhos que avaliam o perfil químico das amostras. Esses trabalhos conseguiram discriminar os produtos de acordo com características como: local de origem; matérias-primas utilizadas, variações de processo, entre outros³⁸.

1.5. Quimiometria

A quimiometria contempla estudos de planejamento experimental e otimização de experimentos, além de reconhecimento de padrões e calibrações multivariadas³⁹. Dentre os métodos utilizados para reconhecimento de semelhanças e diferenças, existe a subdivisão das análises supervisionadas e não-supervisionadas, que se distinguem pela informação prévia da existência dos grupos de amostras, ou seja, quando a informação da natureza da amostra é disponibilizada ao algoritmo. Dois métodos não supervisionados são vastamente conhecidos e utilizados, sendo as análises de componentes principais (PCA) e as análises hierárquicas de agrupamentos (HCA).

Exemplificando um trabalho no qual as análises de padrões tiveram grande impacto com a aplicação das PCA em dados de RMN, pode-se apresentar os resultados obtidos por BOFFO *et. al.* (2009) que analisou os méis produzidos no estado de São Paulo a partir do néctar de laranjeiras, eucaliptos e o mel silvestre. As PCA aplicadas no conjunto de espectros de RMN de ^1H demonstraram as diferenças do perfil químico dos méis de acordo com o tipo de néctar coletado pelas abelhas²⁸.

De acordo com FERREIRA (2015), a PCA é um método capaz de projetar dados multivariados em um espaço de dimensões reduzidas sem que a relação entre as amostras sejam afetadas. Um conjunto de dados multivariados tratado por PCA, passa a apresentar novas variáveis conhecidas como as componentes principais, sendo: PC1, PC2, PC3, e assim sucessivamente. Cada uma destas novas variáveis é ortogonal à anterior, isso significa que a informação contida em cada uma delas não será repetida em outra e que a união de todas as PCs, descreve toda a variância dos dados originais⁴⁰.

As PCA são apresentadas na forma de dois gráficos com informações complementares entre si, o gráfico de *scores* e o gráfico de *loadings*, que devem ser apresentados em conjunto, pois esses gráficos são complementares. Os resultados dessas análises são apresentados na forma de gráficos 2D em que cada eixo representa uma PC. O gráfico de *scores* apresenta as diferenças e semelhanças entre as amostras da análise, enquanto o gráfico de *loadings* apresenta as variáveis que foram relevantes para o deslocamento de determinado grupo de amostras para cada região.

O quimiometrista usa diversos programas que auxiliam o tratamento dos dados, tais como o Matlab[®], o Pirouette[®], o Unscrambler[®], Chemostat[®], entre outros. Existem também, programas desenvolvidos para o uso em conjuntos de dados específicos, como o AMIX[®], que foi desenvolvido para o tratamento de dados de RMN. De maneira geral, todos esses programas utilizam o mesmo princípio para realizar as análises, diminuindo a dimensionalidade dos dados e facilitando a compreensão dos mesmos⁴¹.

CAPÍTULO 2

Objetivos

2. Objetivos

Ainda não existe um protocolo de análise simples e rápido para a determinação da quantidade de cereais não maltados utilizados na produção de cervejas. Portanto, o objetivo deste trabalho consiste na avaliação da presença de cereais não maltados (milho e flocos de arroz) na produção de cervejas com o uso da RMN de alta resolução. Neste escopo, se destacam como objetivos específicos a serem alcançados com esta dissertação: (i) desenvolver uma metodologia capaz de identificar o uso de milho e arroz na produção de cervejas utilizando a ressonância magnética nuclear (RMN) de alta resolução como uma ferramenta analítica. (ii) analisar o perfil metabólico das amostras obtidas na produção de cerveja em laboratório via RMN a fim de estudar o processo de produção. (iii) propor um método no qual seja possível a comparação de cervejas produzidas em laboratório com as cervejas comerciais.

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Produção das cervejas e coleta dos pontos

Para desenvolver este trabalho foi necessário obter amostras de todo o processo produtivo, que foi realizado em um equipamento de escala laboratorial com uma capacidade máxima de 10 litros. Cada produção demandou 15 dias, que foram divididos em: 1 dia de produção do mosto, 7 dias de fermentação e 7 dias de maturação fria. No total, foram realizadas 9 produções de cerveja para que fosse possível reunir o número de amostras necessárias para o desenvolvimento do projeto.

Para iniciar o processo produtivo do mosto, os grãos (malte) foram moídos em um moedor de três rolos para que a parte interior do grão (amido) fosse exposta e triturada, enquanto a casca do grão foi apenas quebrada. No caso dos adjuntos, os grãos de milho foram apenas triturados e os flocos de arroz não foram moídos, sendo utilizados diretamente no início das produções juntamente com o malte de cevada, pois os flocos de arroz já possuem o amido pré-gelatinizado.

Na etapa de brasagem os insumos utilizados foram: água, malte de cevada, lúpulo, grãos de milho e flocos de arroz. A água mineral de poço artesiano foi doada pela empresa Refrigerantes São Carlos® (São Carlos – SP). O malte de cevada utilizado foi o tipo Pilsen proveniente da produtora de malte alemão Bindewald®, a levedura de baixa fermentação utilizada no processo fermentativo foi a SafLager™ W34/70 da empresa francesa Fermentis®, sendo que tanto o malte quanto o fermento foram doados pela empresa Rohbrau® (Piracicaba – SP). Todos os insumos foram estocados no laboratório de RMN em condições adequadas de temperatura e umidade. Os fermentos e lúpulos foram armazenados em geladeira com temperatura média de 8°C, enquanto o malte e as outras fontes de amido foram armazenadas em um ambiente com temperatura entre 20 e 23°C e na presença de um desumidificador de ar, prevenindo a formação de mofo nas fontes de amido.

Durante a pesquisa foram produzidas 11 cervejas, onde as primeiras duas produções foram realizadas para adequação do equipamento e do protocolo de produção. As produções seguintes, foram feitas utilizando a proporção (em massa) de malte de cevada e adjuntos descrito na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Proporção percentual em massa de cereais utilizados nas produções das cervejas em escala de laboratório.

Produção	Malte de Cevada (%)	Flocos de arroz (%)	Milho (%)
3	100	0	0
4	85	0	15
5	70	0	30
6	55	0	45
7	85	15	0
8	70	30	0
9	55	45	0
10	80	10	10
11	60	20	20

Na etapa da produção do mosto foram coletadas amostras de 5 mL a cada 10 minutos a partir do início do processo. Essas amostras foram coletadas em tubos Falcon® de 15 mL e levadas imediatamente ao banho de gelo para interromper a atividade enzimática. Na etapa de cocção do malte, foram utilizados dois patamares de temperatura (45°C e 67°C), ambos durante 30 minutos. Por fim a temperatura foi elevada para 78°C para garantir a desnaturação das enzimas e finalizar o processo de sacarificação do amido. Após a finalização deste processo, iniciou-se o processo de clarificação.

O processo de clarificação do mosto primário durou cerca de 20 minutos durante as produções das cervejas e verificou-se a eficiência deste processo visualmente quando a turbidez do mosto estava suficientemente baixa. Quando foi finalizada a clarificação, o mosto primário foi transferido para a tina de fervura e em seguida ocorreu a lavagem dos grãos, a clarificação do mosto secundário e, posteriormente, a sua união com o mosto primário para que em seguida se iniciasse a fervura do mosto.

A etapa de fervura do mosto teve duração total de 60 minutos a partir do momento em que o mosto entrou em ebulição. Nesta etapa foram coletadas amostras

de 5 mL a cada 10 minutos a partir do início deste processo. Essas amostras foram coletadas em tubos Falcon® de 15 mL e levadas ao banho de gelo imediatamente. No processo de fervura do mosto foi realizada a adição do lúpulo do tipo *Hallertauer Tradition* com 5,7% de α -ácidos. Neste trabalho foram utilizados 8 g de lúpulo por produção sendo adicionado em duas partes iguais: nos tempos zero e cinquenta minutos de fervura.

Na produção em escala laboratorial, a etapa de resfriamento foi realizada utilizando-se banho de gelo que se mostrou extremamente eficaz nesta escala de trabalho, evitando a necessidade do uso de trocadores de calor.

Após o resfriamento do mosto para aproximadamente 10 °C, 2,5 litros foram transferidos para um frasco Erlenmeyer de 3 litros previamente esterilizado em uma autoclave. Em seguida foram adicionadas 1,44 g de levedura seca, que foi cuidadosamente homogeneizada. O frasco teve seu bocal tampado com plástico filme de PVC e foi levado para a geladeira com controlador de temperatura ajustado para 12 °C. O restante de mosto que encontrava-se na tina de fervura foi utilizado para coletar o ponto zero da fermentação.

Neste trabalho as primeiras 48 horas do processo de fermentação não passaram por nenhuma interferência a fim de evitar que a levedura sofresse qualquer perturbação e também para evitar contaminações. Ao fim das primeiras 48 horas, o mosto em fermentação foi cuidadosamente homogeneizado e dividido em frascos Erlenmeyer de 125 mL, também previamente esterilizados em autoclave, que foram preenchidos com 75 mL de mosto em fermentação que, em seguida, foram levados de volta à geladeira com controle de temperatura ajustado para 12 °C. O processo de particionar o mosto em fermentação foi realizado adequadamente em câmara de fluxo laminar com objetivo de evitar contaminações e facilitar a retirada das amostras durante o processo de fermentação.

Em seguida, os frascos foram levados de volta à câmara de fermentação com controle de temperatura onde o processo continuou até o sétimo dia. A partir do segundo dia de fermentação deu-se início a retirada diária das alíquotas das amostras de cerveja (retirados dois Erlenmeyers como duplicata). A coleta de amostra foi feita transferindo 10 mL da cerveja para um tubo Falcon® que foi centrifugado a 10 mil rpm (temperatura controlada à 5 °C) retirando-se o sobrenadante e dividindo o mesmo em

tubos Eppendorf® de 5 mL que foram identificados e devidamente armazenados no freezer à -20 °C do laboratório de RMN da UFSCar para posterior análise.

Após 7 dias de fermentação o controlador de temperatura da câmara de fermentação foi ajustado para 5 °C e foi iniciada a coleta dos pontos da etapa de maturação da cerveja. Esta coleta foi diária e seguiu o mesmo protocolo da coleta dos pontos da fermentação.

3.2. Preparo das amostras

O protocolo de preparo de amostra foi desenvolvido com objetivo de ser simples e prático, pois quanto menor a manipulação da amostra, menor a quantidade de erros associados ao preparo. Desta maneira o protocolo de preparo e análise das amostras foram: descongelar a amostra; transferir uma alíquota de 450 uL da amostra para um tubo Eppendorf® de 2 mL onde foram adicionados 50 uL de uma solução 0,2% de TMS- d_4 em D_2O . Em seguida, homogeneizou-se a solução com o auxílio de um equipamento de agitação automático e então, foi utilizada uma micropipeta para transferir 450 uL desta solução para um tubo de RMN de 5mm. O tubo foi inserido em um rotor que em seguida foi alocado em uma posição do amostrador automático do equipamento de RMN para posterior análise.

3.3. Obtenção dos espectros de RMN de 1H .

As análises espectroscópicas de RMN foram realizadas em um equipamento BRUKER de 9,4 Tesla (400,23 MHz para a frequência do hidrogênio) modelo AVANCE III, equipado com uma sonda para amostras líquidas em tubos com 5 mm de diâmetro e com detecção inversa e unidade de gradiente de campo na direção do eixo z. Para a obtenção dos espectros de RMN de 1H foram utilizadas as sequências de pulsos ZG30, a NOESYGPPR1D e a LC1PNCWPS (denominação BrukerBiospin®), cada uma delas com um propósito específico.

A sequência de pulso nomeada “ZG30” possui apenas um pulso de 30° como observado na Figura 3.1. Os seus principais parâmetros de aquisição foram: **TD** de

65.536, **DS** de 4, **NS** de 8, **SW** 20,6 ppm, **AQ** de 3,98 s, **RG** de 2, **D1** de 4 s e **O1P** 4,7 ppm (denominação BrukerBiospin®).

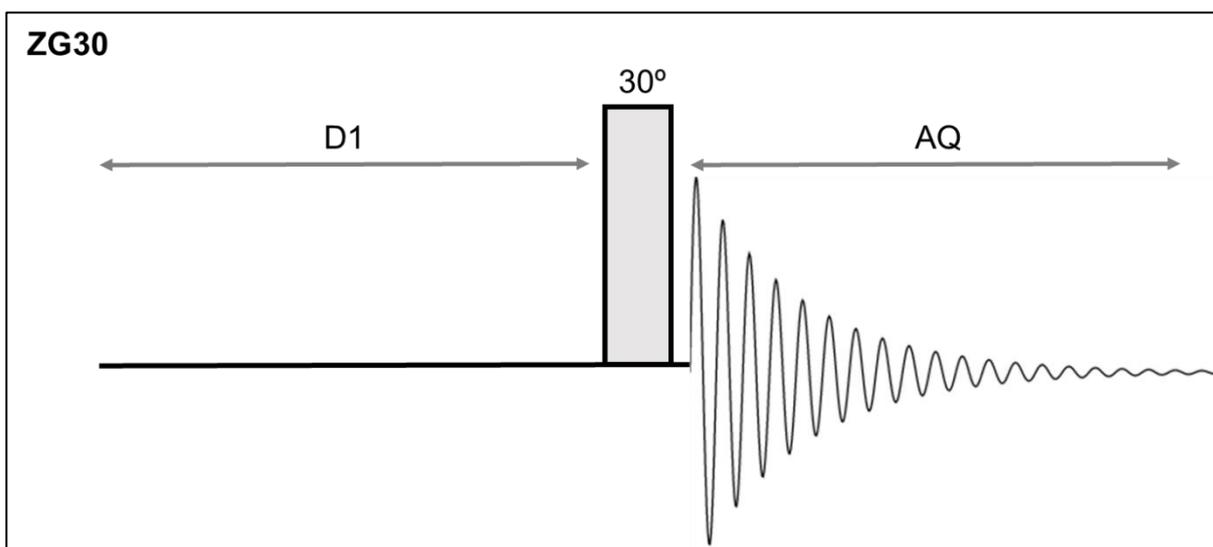


Figura 3.1 – Modelo explicativo da sequência de pulso ZG30 (Denominação BrukerBiospin®).

A sequência de pulsos nomeada “NOESYGPPR1D” foi a que melhor saturou o sinal de água nas amostras analisadas e o seu modelo esquemático pode ser observado na Figura 3.2. Os principais parâmetros de aquisição foram: **TD** de 65.536, **DS** de 4, **NS** de 32, **SW** 20,6 ppm, **AQ** de 4,09 s, **RG** de 8, **D1** de 4 s, **D8** de 0,01 s, **P0** de 9,040 μ s, **P1** de 9,040 μ s e **O1P** 4,699 ppm (denominação BrukerBiospin®). Essa sequência é mais complexa que a sequência ZG30 devido ao maior número de pulsos e pelo uso de gradiente que tornam possível a saturação do sinal referente aos hidrogênios da água.

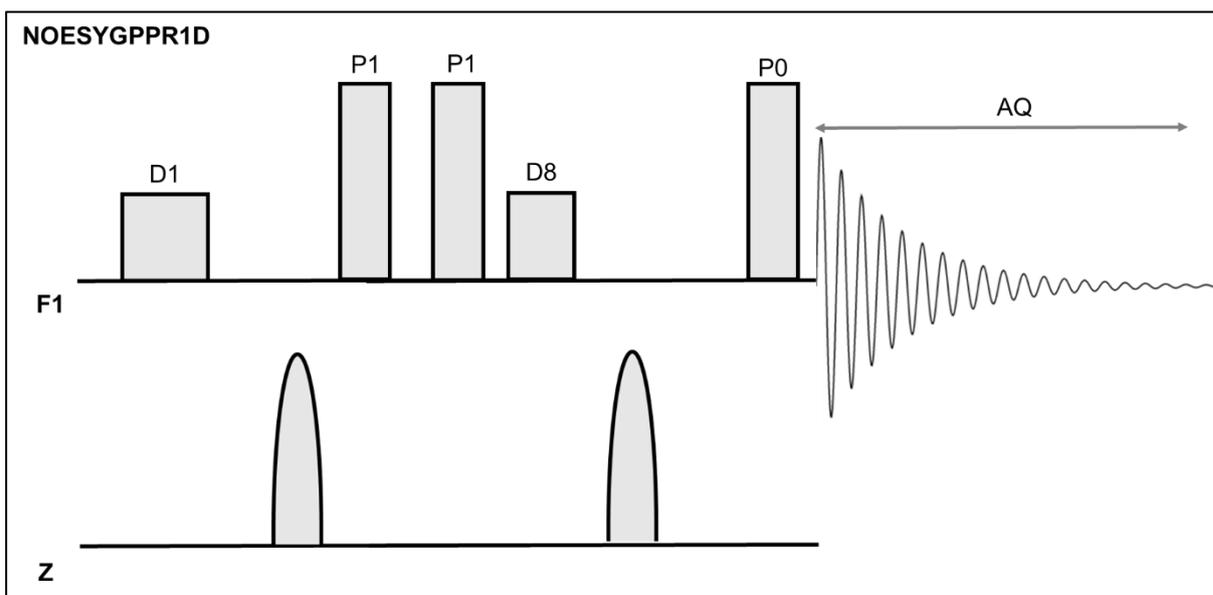


Figura 3.2 – Modelo explicativo da sequência de pulso NOESYGPPR1D (denominação BrukerBiospin®).

Nas amostras provenientes do processo fermentativo os sinais do etanol são muito intensos em relação aos sinais das outras substâncias presentes, tornando necessário o uso da sequência nomeada como “LC1PNCWPS”, que é capaz de suprimir os sinais majoritários, facilitando a observação dos sinais minoritários. Na Figura 3.3 observa-se o modelo esquemático da sequência LC1PNCWPS, sendo que os principais parâmetros de aquisição que foram: **TD** de 65.536, **DS** de 4, **NS** de 32, **SW** 20,6 ppm, **AQ** de 4,09 s, **RG** de 90,5, **D1** de 4 s, **D8** de 0,5 s, **P1** de 8,710 μ s e **O1P** 1,088 ppm (parâmetros da denominação BrukerBiospin®). Esta sequência foi ajustada para as análises das cervejas. O **PF** é um pulso formatado para a saturação dos sinais desejados e essa característica torna esta sequência pouco robusta quando comparada às anteriores, pois variações na quantidade de água e etanol implicam em uma saturação inadequada. Além da supressão de sinais, esta sequência possibilita a obtenção de espectros que não possuem sinais provenientes do acoplamento entre ^1H com o ^{13}C .

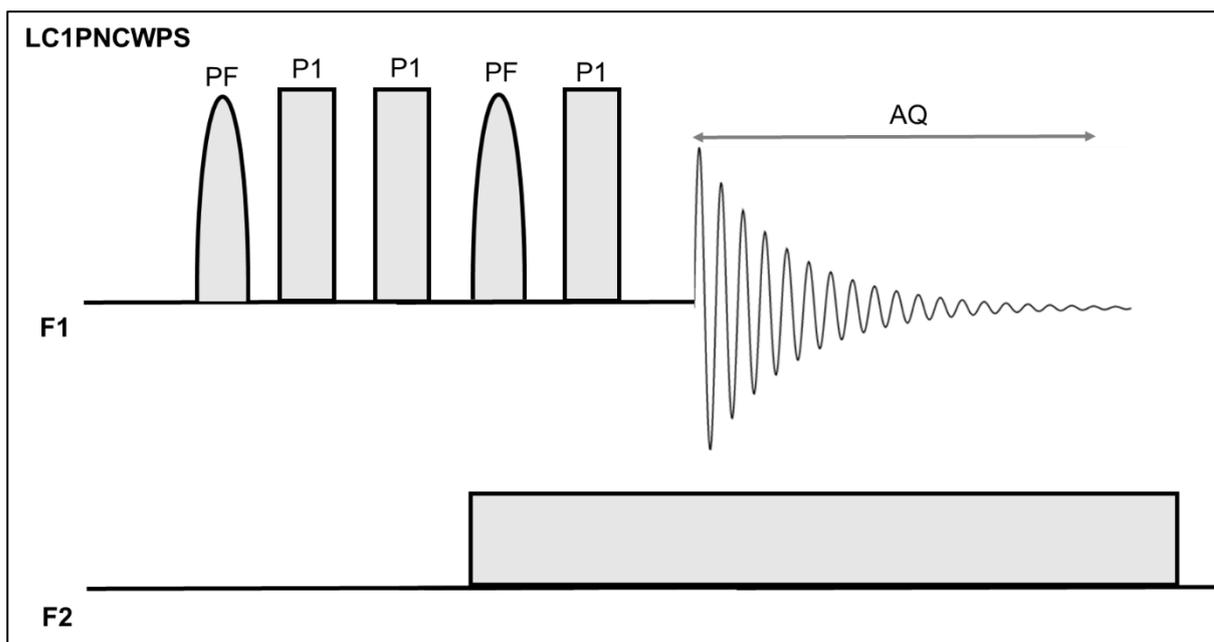


Figura 3.3 – Modelo explicativo da sequência de pulso LC1PNCWPS (denominação BrukerBiospin®).

Todos os experimentos de RMN de ^1H que foram adquiridos para o uso nas análises quimiométricas foram obtidos e processados de maneira automatizada. Esse procedimento automatizado é realizado utilizando o programa IconNMR® que é parte do programa computacional Topspin® da empresa Bruker®. O processamento dos espectros adquiridos foi realizado utilizando apenas as funções realizadas pelos comandos: **EFP**, **APK** e **ABSN** (linguagem Bruker® no programa computacional Topspin®).

O comando **EFP** aplica uma função de apodização (**LB** de 0.3) que multiplica o sinal do **FID** e em seguida aplica a transformada de Fourier no **FID**, esse processamento faz com que a relação sinal/ruído aumente e visualmente a linha de base do espectro passa a ser menos ruidosa, resultando em uma melhor aparência do espectro de RMN de ^1H .

Os comandos **APK** e **ABSN** realizam o ajuste da fase e da linha de base do espectro, respectivamente. Dessa maneira são corrigidas pequenas imperfeições no espectro com esses processamentos de aplicação rotineira. Em poucos casos foram necessários realizar o alinhamento manual do espectro.

CAPÍTULO 4

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análises preliminares dos espectros de RMN de ^1H

Para as amostras de mosto, os espectros de RMN de ^1H foram obtidos aplicando-se as sequências de pulsos ZG30 e a NOESYGPPR1D. A supressão do sinal de água é de alta relevância para o estudo do perfil metabólico das amostras, porque nelas a água é o componente majoritário e sem suprimir este sinal torna-se difícil observar qualquer outro sinal pertencente à amostra. No caso das amostras coletadas a partir do início do processo fermentativo, também aplicou-se a sequência LC1PNCWPS.

Os espectros de RMN de ^1H obtidos com a aplicação da sequência ZG30 em uma amostra de mosto e uma amostra de cerveja, ambas produzidas exclusivamente com malte, estão demonstrados na figura 4.1. A sequência ZG30 gerou resultados simples por não haver nenhuma saturação de sinal, basicamente, observa-se apenas os sinais majoritários da água e do etanol (quando presente) e em uma proporção menor alguns sinais minoritários como na região dos compostos alifáticos e o sinal do TMSP-d4 quando expande-se o espectro.

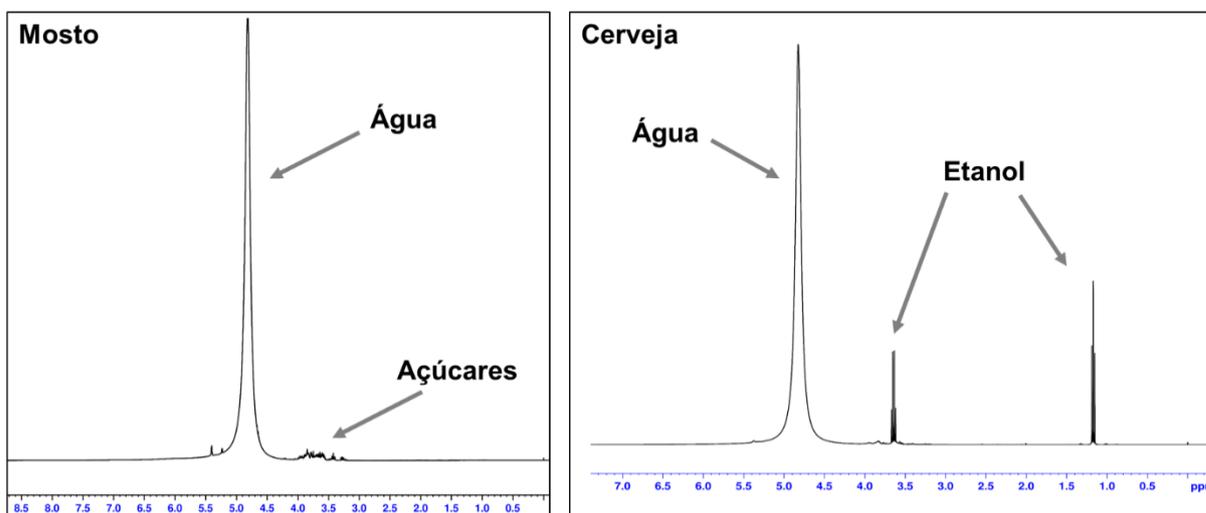


Figura 4.1 – Espectros de RMN de ^1H do mosto e da cerveja obtidos utilizando a sequência de pulso ZG30 no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D_2O .

Com o intuito de suprimir o sinal referente à água para observar sinais de menor intensidade, utilizou-se a sequência de pulso NOESYGPPR1D, que é uma sequência mais complexa que a sequência ZG30. Sua utilização permitiu a saturação do sinal referente aos hidrogênios da água facilitando a observação dos sinais de menor intensidade no mosto (Figura 4.2) e na cerveja (Figura 4.3). No espectro do mosto pode-se analisar com clareza quase todas as regiões do espectro de RMN de ^1H , nessa análise foi verificado que os sinais mais intensos são os sinais provenientes dos açúcares, conseqüentemente demonstra-se que essas são as substâncias com maior concentração no mosto.

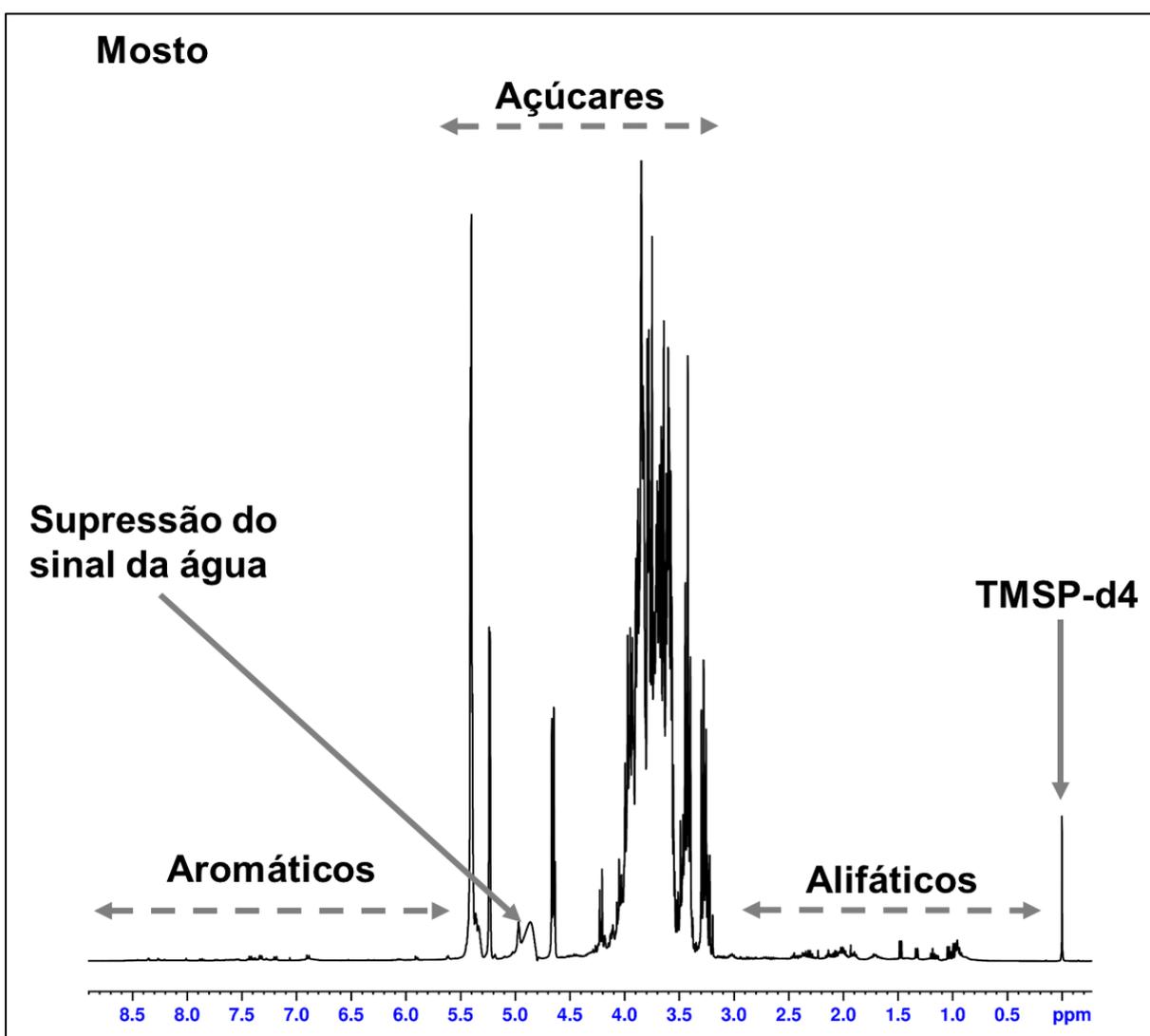


Figura 4.2 – Espectro de RMN de ^1H do mosto obtido utilizando a sequência de pulso NOESYGPPR1D no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D_2O .

Nos espectros referentes às amostras de cerveja, pode-se observar que os sinais referentes ao etanol são muito intensos e expandindo-se a região dos compostos alifáticos observa-se os sinais referentes às seguintes substâncias: ácido succínico, ácido pirúvico, ácido acético e alanina. Essas substâncias foram caracterizadas utilizando como base espectros de RMN 2Ds, a literatura, os bancos de dados (HMDB⁴² e YMDB⁴³) e o software Chenomx^{®44}.

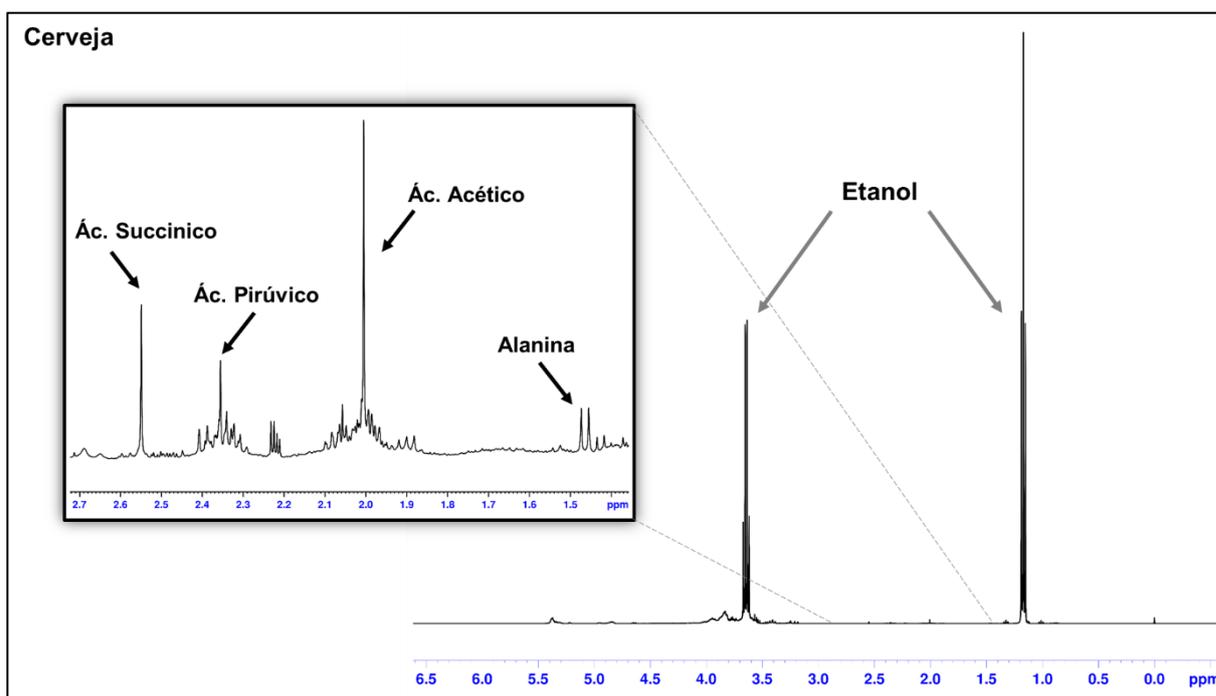


Figura 4.3 – Espectro de RMN de ¹H de cerveja obtido utilizando a sequência de pulso NOESYGPPR1D no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D₂O.

Nas amostras provenientes do processo fermentativo, os sinais do etanol são intensos em relação aos sinais de outras substâncias (Figura 4.3). Para auxiliar na observação dos sinais minoritários das amostras utilizou-se a sequência LC1PNCWPS capaz de suprimir os três sinais majoritários das amostras do processo fermentativo. Na Figura 4.4, observa-se o espectro resultante do uso desta sequência, no qual é apresentada a expansão da região de 5,50 ppm até -0,50 ppm. Nesta região é notável que os sinais majoritários ainda encontram-se presentes no espectro. Porém, quando se compara a intensidade dos mesmos com o sinal de referência (TMNSP-d₄), observa-se que a supressão foi eficiente.

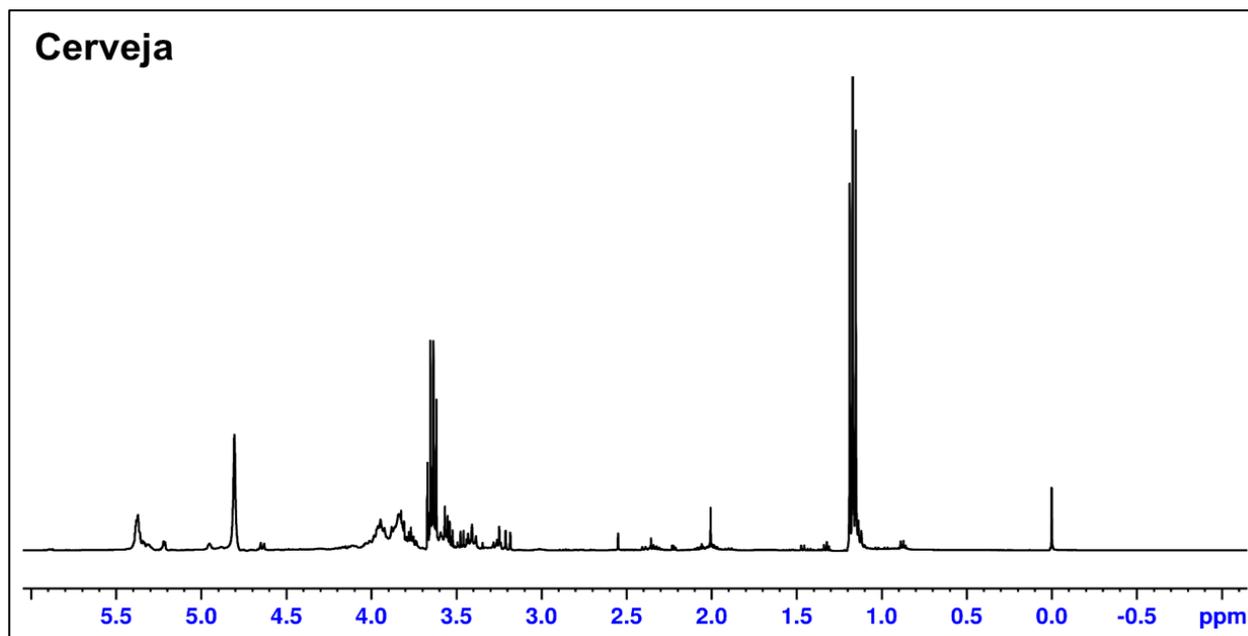


Figura 4.4 – Espectro de RMN de ^1H de cerveja obtido utilizando a sequência de pulso LC1PNCWPS no equipamento de RMN de 9,4 Tesla em D_2O .

A parti das análises dos resultados obtidos pela aplicação dessas sequências de pulsos, foi realizada a análise preliminar dos espectros de RMN de ^1H das amostras de cervejas que seriam as mais distintas entre si: as produções 3 (100% malte), 6 (45% Milho) e 9 (45% Arroz). Nesta análise verificou-se que o perfil dos espectros são semelhante, como observa-se na comparação da expansão da região dos compostos alifáticos (Figura 4.5). Percebe-se também que a proporção dos metabólitos presentes nas cervejas variou nas produções, indicando diferenças entre as cervejas produzidas utilizando fontes de amido distintas, apesar de serem os mesmos metabólitos.

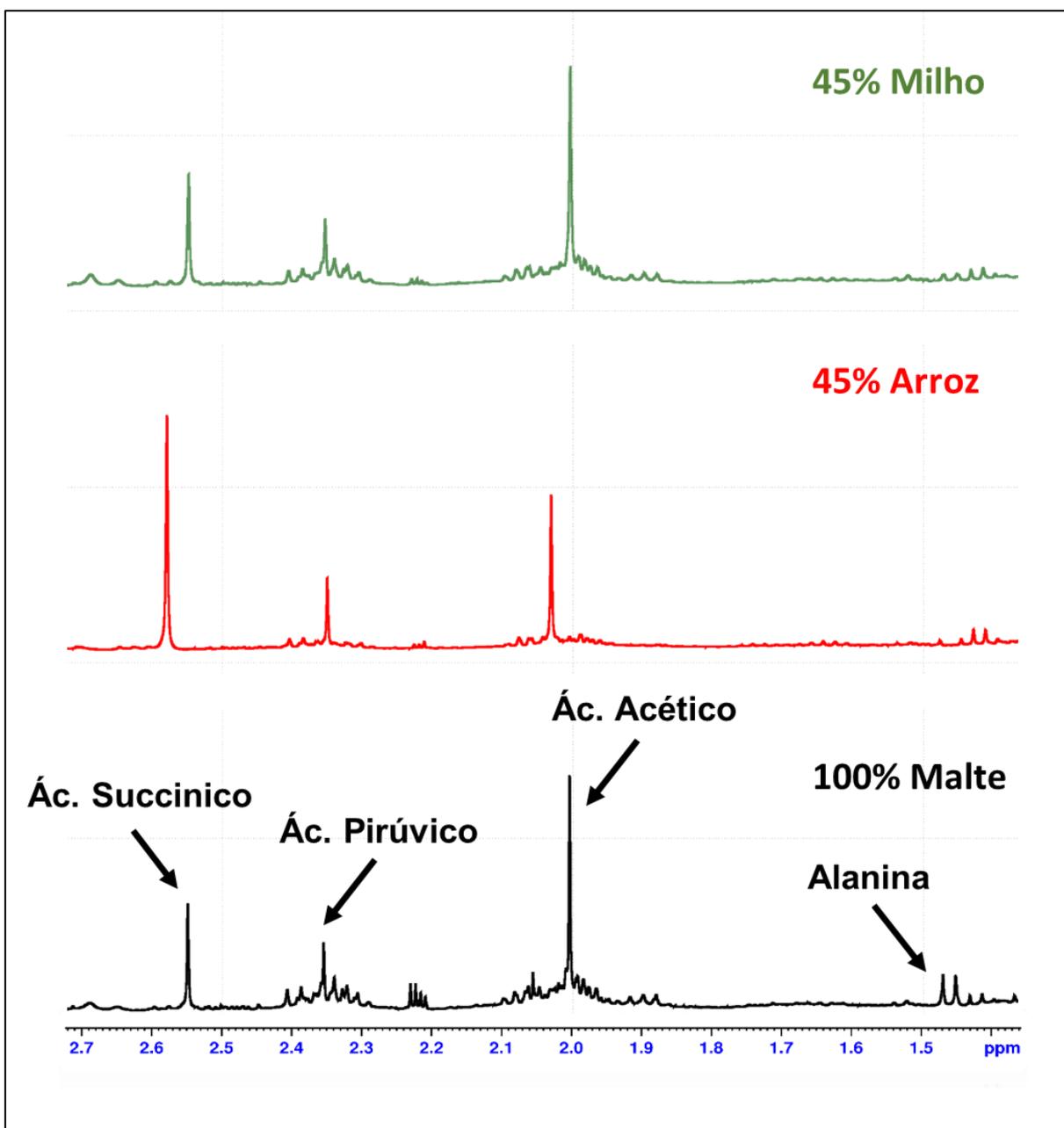


Figura 4.5 – Comparação entre as expansões dos espectros de RMN de ¹H de cerveja obtidos utilizando a sequência de pulso NOESYGPPR1D no equipamento de RMN de 9,4 Tesla (D₂O) das amostras das produções 100% Malte, 45% Arroz e 45% Milho.

Também foi avaliada a variação dos metabólitos em relação ao tempo, tanto da etapa quente quanto da etapa fria. Como esperado, durante a etapa quente observou-se o aumento da intensidade dos sinais na região dos açúcares. Este resultado foi

importante para demonstrar que o método é capaz de observar as mudanças metabólicas esperadas.

Durante a etapa fria observa-se o aumento da intensidade dos metabólitos como o ácido succínico, o ácido pirúvico, o ácido acético e o etanol. Desta maneira percebe-se que os dados obtidos refletem o que se esperava deste trabalho no quesito do acompanhamento da variação dos metabólitos durante a produção das cervejas.

Foi verificado que existem sutis diferenças entre os espectros das cervejas das diferentes produções, entretanto, a separação visual das produções baseadas nos espectros de RMN de ^1H foi inviável, portanto, para melhor observar essa distinção dos dados foi necessário o apoio da quimiometria. As análises quimiométricas realizadas foram as análises de componentes principais (PCA).

4.2. Análise quimiométrica das amostras de mosto.

Na primeira fase do tratamento quimiométrico dos dados obtidos, decidiu-se utilizar o conjunto de amostras da produção do mosto e essas análises foram realizadas utilizando o programa Amix[®] versão do pacote 3.9.3.

A primeira etapa do tratamento dos dados é a montagem da *bucket table* (arquivo gerado a partir de um espectro para a análise quimiométrica). Nessa etapa decidiu-se quais áreas do espectro seriam utilizadas, ou seja, como seriam selecionadas as áreas de interesse para a o tratamento quimiométrico. Uma área que é comumente eliminada das PCA é o sinal de referência (TMSP-d₄), pois este é utilizado somente para definir o ponto zero do espectro e avaliar a qualidade do *shimming* durante a aquisição dos dados.

Ainda durante a montagem da *bucket table* é necessário definir qual será o tamanho dos *buckets*, que são as áreas de integração dos espectros. Para isto, existem duas principais maneiras de definir os *buckets*: a primeira é a definição de *buckets* fixos, neste caso o espectro é subdividido em várias áreas de mesmo tamanho; a segunda opção são os *buckets* de tamanho variável, nesta maneira é possível selecionar as áreas de interesse para a análise. Ao selecionar um pico específico se evita o problema de subdividi-lo em mais de um *bucket*, assim os *buckets* não precisam ter o mesmo tamanho (Figura 4.6). Na Figura 4.6, podemos observar as vantagens da escolha de *buckets* variáveis para a montagem da *bucket table*, pois no

caso de espectros de RMN, podemos selecionar um sinal inteiro referente a uma substância. Porém, é importante salientar que é importante verificar se o sinal está contido no *bucket* em todos os espectros do conjunto de amostras e que em casos onde encontra-se muita sobreposição de sinais a escolha entre *buckets* simples ou variáveis não demonstra diferenças significativas.

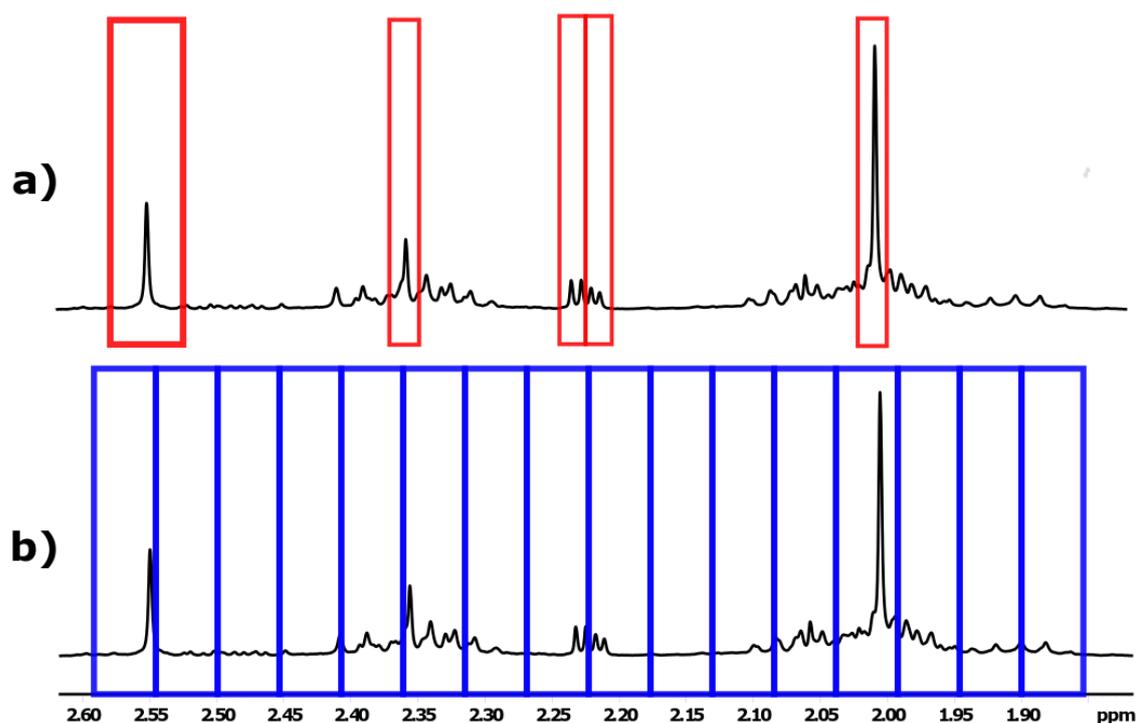


Figura 4.6 – Exemplificação da escolha dos *buckets* para montagem da *bucket table*. Em (a) os *buckets* em vermelho selecionando exatamente os picos de interesse em uma expansão de um espectro de RMN de ^1H de uma amostra de cerveja e em (b) a mesma região do espectro subdividido em *buckets* de tamanho fixo de 0,05 ppm.

Outro ponto importante nas PCA é o pré-processamento dos dados, neste trabalho foi realizado a comparação entre a utilização dos dados escalonados e os dados não escalonados utilizando o programa AMIX[®]. Genericamente, o escalonamento dos dados faz com os sinais do espectro passem a ter a mesma importância na análise, independentemente da intensidade dos mesmos. Desta maneira, nos casos em que os sinais de baixa intensidade têm uma variação maior que os sinais intensos quando comparados proporcionalmente, os sinais menos

intensos serão responsáveis pela separação das amostras pois possuem maior variabilidade. Portanto, ao escalonar os dados se evidencia a importância dos sinais pouco intensos, mas que possuem grande variação de intensidade⁴⁰.

No primeiro conjunto de análises quimiométricas do mosto, utilizou-se os espectros de RMN de ¹H obtidos com a sequência de pulso NOESYGPPR1D, avaliado todo o perfil dos espectros e utilizou-se *buckets* fixos de 0,05 ppm não escalonados. Foram retiradas do espectro somente as áreas referentes à supressão do sinal do HDO (5,35 – 4,75 ppm) e as áreas acima de 9,00 ppm e abaixo de 0,50 ppm por não possuírem sinais. Nesta análise os gráficos resultantes mostraram a distinção das amostras referentes às etapas da produção do mosto. Entretanto, decidiu-se realizar, também, a análise dos mesmos dados com os *buckets* escalonados, desta maneira foram encontrados resultados ligeiramente melhores e que estão mostrados na Figura 4.7.

Na PCA da Figura 4.7 pode-se observar: em (a), a distinção dos pontos da produção do mosto no gráfico de *scores*, os quais foram nomeados como M2, M3, M4, até M11, que é a união da letra “M” de mosto e o número referente ao ponto da coleta, (segundo, terceiro, até o décimo primeiro). Os pontos M2 e M3 se encontram na região com maior valor positivo da PC1 e na região negativa de PC2, à medida que o processo produtivo do mosto evolui os grupos de amostras começam a se deslocar para a região negativa da PC1 (amostras M4 e M5) e, já no final do processo de produção do mosto, as amostras M6 até M11 encontram-se na região negativa da PC1 e em (b) está apresentado o gráfico de *loadings*.

O ponto M6 é o ponto de início da elevação da temperatura do mosto para o patamar de temperatura da sacarificação. Na região da PC1 negativa, os grupos de amostras de coleta posterior à M6 se aproximam devido aos sinais da região de açúcares como observa-se na comparação entre os gráficos de *scores* e *loadings* (Figura 4.7). Isso demonstra que quando o mosto encontra-se na temperatura de ação da α -amilase e da β -amilase, o amido do malte é transformado em açúcares e os pontos coletados a partir desse momento têm sinais de açúcares mais intensos. Conseqüentemente esses sinais são os responsáveis pela separação dos grupos na PC1 x PC2. Nos gráficos referentes às outras componentes principais, tais como PC2 por PC3 e PC3 por PC4 a separação não se mostrou clara.

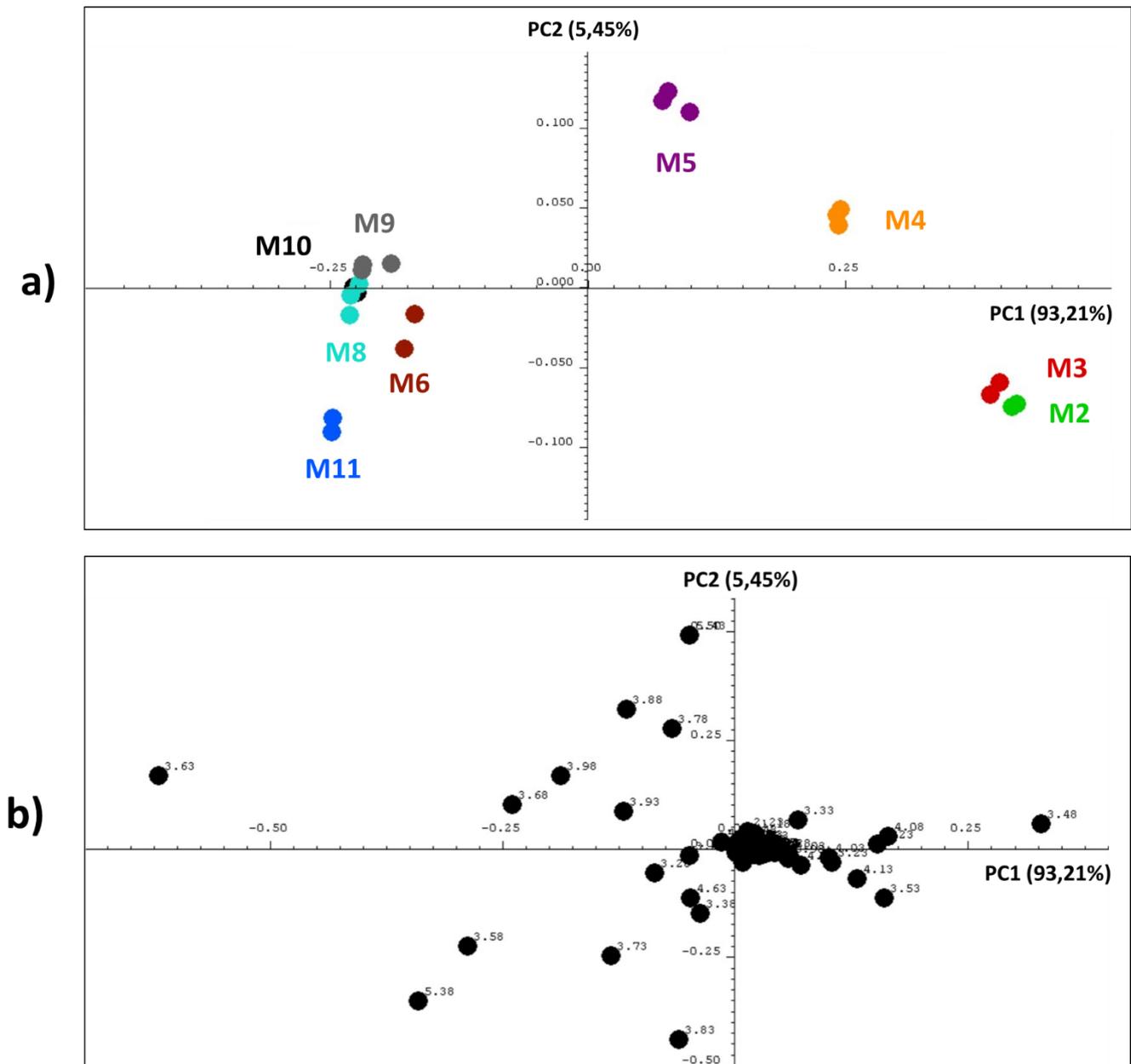


Figura 4.7 – Gráfico de PCA das amostras de mosto produzidos exclusivamente com malte de cevada como fonte de amido. Em (a) está apresentado o gráfico de *scores* e em (b) está apresentado gráfico de *loadings*. Em (a) M2 significa 2º ponto do mosto, M3 significa 3º ponto do mosto e assim sucessivamente até M11.

Essa mesma análise foi realizada para as amostras de mosto produzido com 45% de milho e para aquelas com 45% de flocos de arroz. Os resultados obtidos seguiram o mesmo padrão dos resultados obtidos com o mosto produzido com 100% de malte.

A partir destes resultados, foi realizada uma PCA utilizando os grupos de amostras referentes aos 3 últimos pontos de cada produção de mosto, utilizando os dados obtidos a partir das produções 3, 6 e 9 (100% malte, 45% milho, 45% flocos de arroz respectivamente). O intuito desta análise foi verificar se a separação entre as produções com as diferentes fontes de amido seriam observadas em todas as etapas produtivas. A montagem da *bucket table*, o escalonamento e a exclusão de áreas do espectro foram exatamente iguais aos tratamentos dos resultados anteriores.

Os resultados da PCA apresentados na figura 4.8 demonstram a capacidade do método em distinguir as amostras de mosto produzidos com diferentes cereais utilizando o perfil do espectro de RMN de ^1H . Nesta análise (Figura 4.8 a), as amostras de mosto produzidos apenas com malte foram posicionadas na região negativa da PC1. Enquanto, as amostras de mosto produzidas com 45% de milho foram posicionadas na região central e as amostras de mosto produzido com 45% de flocos de arroz encontram-se na região positiva da PC1. Esse resultado indica a capacidade do método em distinguir as fontes de amido utilizados na produção do mosto.

Neste gráfico (figura 4.8), as últimas amostras de mosto de cada produção foram posicionadas na região negativa da PC2. Correlacionando com o gráfico de *loadings* (Figura 4.8 b) verifica-se que a separação ocorreu devido aos sinais em 5,38 ppm e 3,83 ppm do espectro de RMN de ^1H . Esses sinais são responsáveis por deslocar o grupo dos últimos pontos da produção dos mostos para a região negativa de PC2. Portanto, a PCA demonstra a separação das amostras pelo uso de diferentes fontes de amido no eixo da PC1 e pela quantidade de açúcar presente no mosto no eixo da PC2.

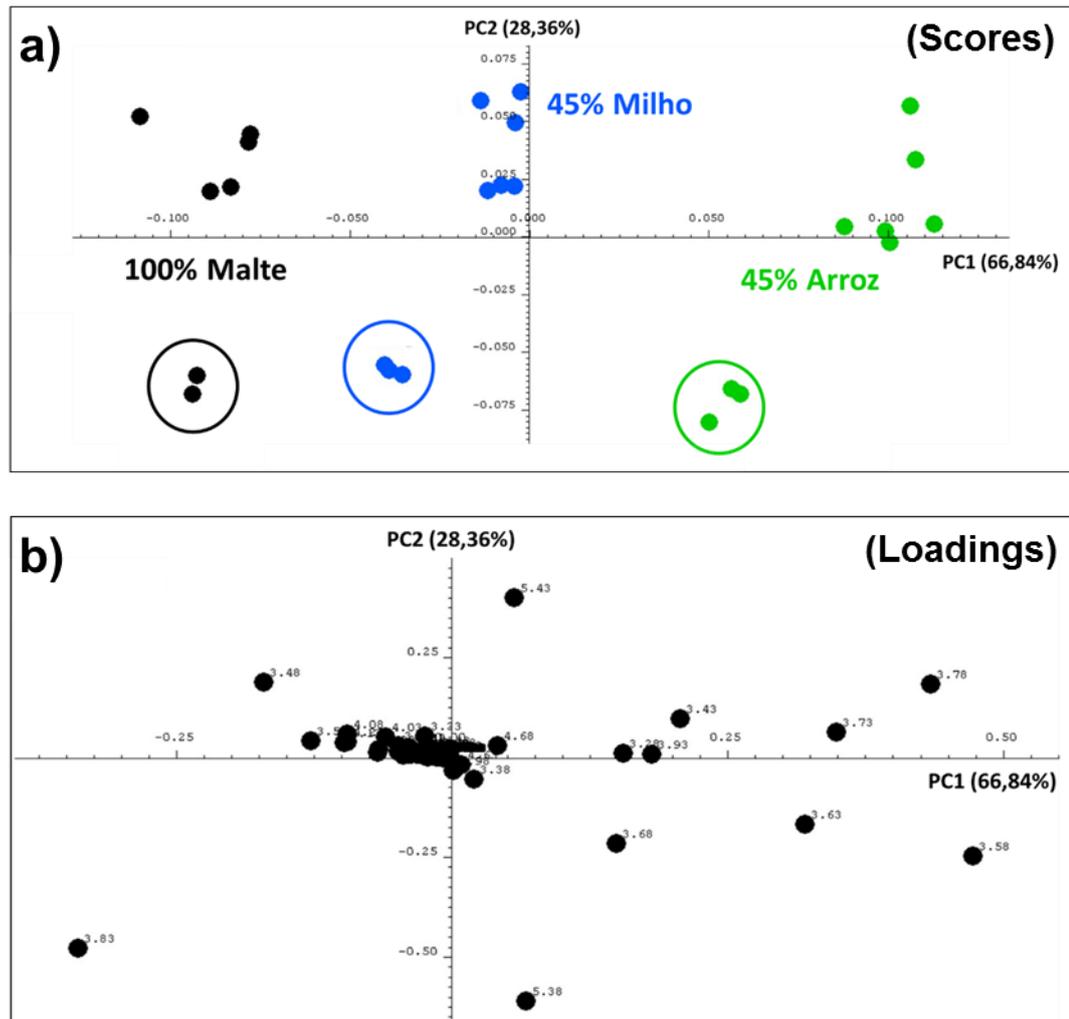


Figura 4.8 – Gráfico de PCA das amostras de mosto das produções 3, 6 e 9. Em (a) está apresentado o gráfico de *scores* da PC1 x PC2, em preto a produção 3 (100% malte), em azul a produção 6 (45% milho), em verde a produção 9 (45% arroz), os grupos circulados são o último ponto da produção de cada mosto. Em (b) está apresentado gráfico de *loadings* da PC1xPC2.

4.3. Análise quimiométrica das amostras da fervura do mosto.

Foram realizadas as análises de PCA utilizando os espectros de RMN de ^1H dos dados referentes as 6 amostras coletadas durante a etapa de fervura do mosto de uma única produção. Os resultados destas análises demonstraram que não houve variações relevantes entre as amostras. Esses resultados condizem com o esperado, pois durante o processo de fervura ocorre a evaporação de parte da água do mosto, que conseqüentemente resulta no aumento da concentração dos componentes do mosto, que não representam uma mudança de composição química.

Entretanto, existem algumas mudanças químicas no mosto durante a fervura, como a isomerização dos os α -ácidos em iso- α -ácidos como descrito no item 1.3. No entanto, utilizando o método deste trabalho estes os compostos minoritários não foram observados. Deste modo a análise de PCA das amostras do mosto durante a fervura, não apresenta diferença significativa entre as amostras.

A análise seguinte foi a comparação entre as produções de número 3, 6 e 9, seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente. Nessas análises foram excluídas as regiões acima de 9,00 ppm, abaixo de 0,50 ppm e entre 5,00 e 4,75 ppm no espectro de RMN de ^1H . A montagem da *bucket table* foi realizada com a seleção de áreas iguais de 0,05 ppm e foram feitas análises tanto com os dados escalonados quanto com os dados não escalonados.

A figura 4.9 representa os resultados dessas análises, em (a) está apresentado o resultado da PCA sem o escalonamento dos dados, no qual observa-se a separação das amostras do mosto produzido somente com malte de cevada dos mostos produzidos com 45% de adjuntos. Porém a separação entre o mosto produzido utilizando milho e flocos de arroz não é bem definida como no resultado da PCA com escalonamento dos dados que é observado na figura 4.9 (b). Esse resultado reforça o uso do escalonamento nos dados de RMN que são utilizados nos tratamentos estatísticos.

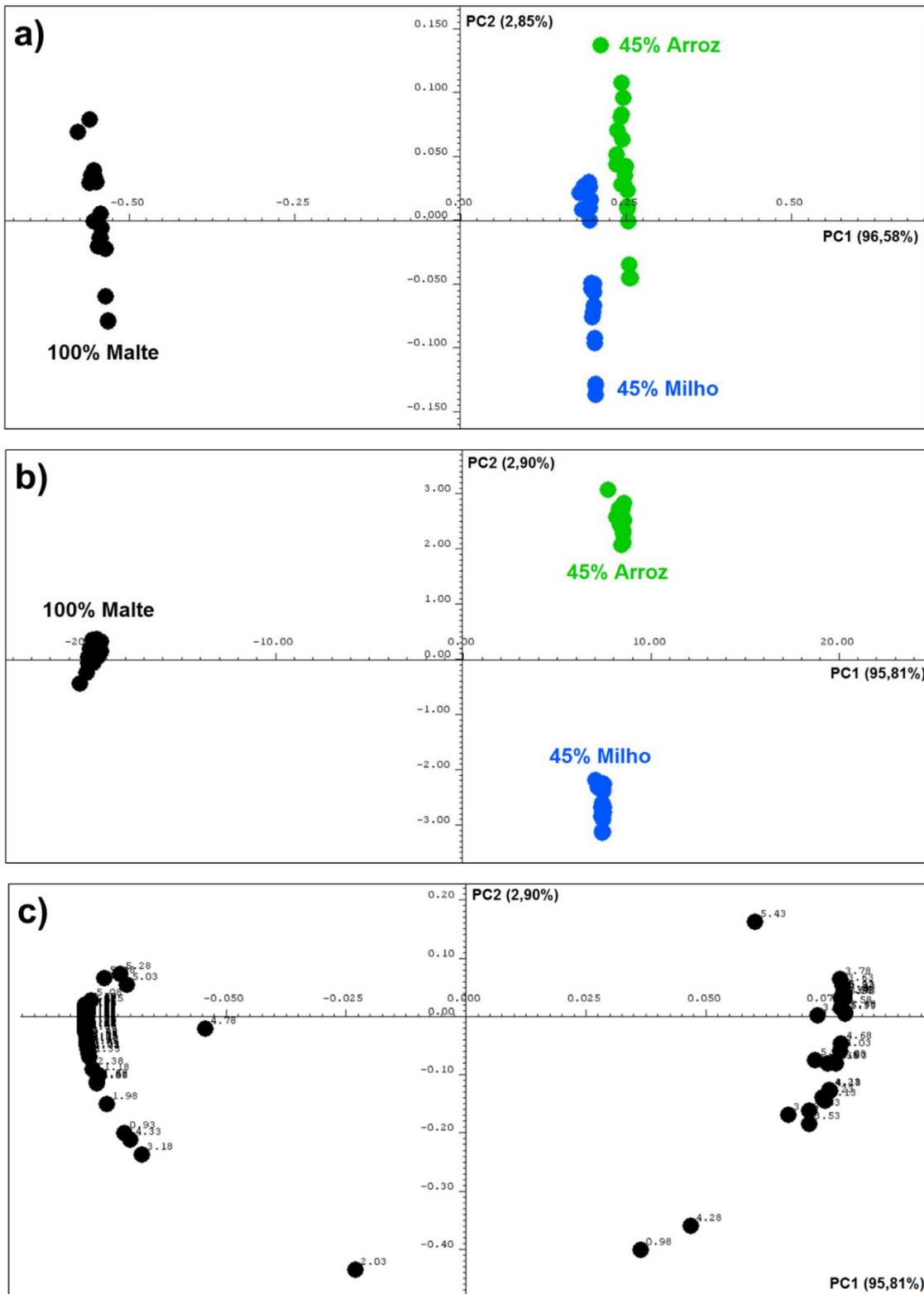


Figura 4.9 – Gráfico de PCA das amostras da etapa de fervura do mosto das produções 3, 6 e 9. Em (a) o gráfico de *scores* da PC1 x PC2, 3 (preto; 100% malte), 6 (azul; 45% milho), 9 (verde; 45% arroz) (dados não escalonados). Em (b) os mesmos dados foram escalonados. Em (c) o gráfico de *loadings* da PC1 x PC2 dos dados escalonados.

4.4. Análise quimiométrica das amostras de cerveja.

Após a análise dos resultados anteriores, decidiu-se aplicar o método descrito anteriormente para avaliar a evolução nas amostras de cervejas durante o processo de fermentação, o qual teve coletas de pontos diários que tiveram início 48 h depois da inoculação das leveduras no mosto fervido.

Primeiramente, foram utilizados os espectros de RMN de ^1H das amostras da produção nº 3 (100% malte de cevada). Na análise dos dados, a montagem da *bucket table* foi realizada com *buckets* simples. No qual, foram excluídas das análises as regiões dos espectros referente ao sinal da água e os extremos dos espectros onde não havia sinais. As análises de PCA realizadas com esse tratamento de dados não demonstrou separação entre grupos de amostras, por esse motivo decidiu-se alterar o método de análise e reavaliar o mesmo conjunto de dados.

Nessa reavaliação dos dados com outro tratamento, optou-se por utilizar os metabólitos majoritários que foram identificados e que são amplamente conhecidos na via metabólica das leveduras, além de alguns sinais de açúcares. Esses sinais foram selecionados para avaliar o desenvolvimento da formação de metabólitos durante a fermentação e maturação do mosto.

Todas as análises quimiométricas deste trabalho foram realizadas utilizando o programa computacional Amix®. Além do processamento dos dados, este *software* também permite realizar parte do processamento dos espectros de RMN de ^1H , facilitando correções e comparações que não são possíveis de serem realizadas no programa computacional Topspin®, que é o programa utilizado para operação do equipamento de RMN e processamento dos dados.

O *software* Amix® permite sobrepor todos os espectros de RMN que serão utilizados na análise estatística, ao realizar essa sobreposição é possível verificar espectros de amostras que não estão adequados para serem utilizados na análise. Na maioria dos casos, isso decorre de problemas na automação para realizar o ajuste do campo magnético antes da aquisição do espectro de RMN (*shimming*). Após a aquisição dos espectros de RMN de ^1H , a qualidade do campo magnético é verificada pelo sinal da referência interna (TMSP- d_4). Antes de realizar a análise de PCA os

espectros foram sobrepostos e foram descartados os espectros das amostras que tiveram sua aquisição realizada sem que o campo magnético estivesse adequado.

As análises anteriores foram todas realizadas com *buckets* de tamanho fixo em ppm. Esse tratamento tem a vantagem de ser mais prático, porém em alguns casos os sinais de RMN podem ser levemente deslocados. Esse deslocamento dos sinais, pode ocorrer pela variação do pH da solução, concentração da amostra e variação de temperatura da análise. Nesse caso, se a seleção dos *buckets* for realizada dividindo igualmente o espectro com faixas iguais em ppm, caso haja um deslocamento de sinais, as amostras podem ser separadas em grupos diferentes em uma PCA, pela variação da localização do sinal no espectro, mesmo que as duas amostras tenham a mesma substância na mesma concentração.

Variações grosseiras de deslocamento químico não podem ser corrigidas utilizando *buckets* variáveis, pois caso haja outros picos dentro da mesma área, isso irá gerar erros na análise. Entretanto, pequenas variações no deslocamento químico podem ser corrigidas. Neste trabalho foi utilizada essa correção nos casos em que foi usado *buckets* variáveis. Quando os espectros de RMN de ^1H utilizados nas análises foram sobrepostos, foi verificada a faixa de deslocamento químico dos sinais de interesse. Então os *buckets* foram montados de maneira que essa variação de deslocamento não fosse o suficiente para que o sinal fosse deixado fora do *bucket*.

As análises mostraram o desenvolvimento e a separação dos processos de fermentação e maturação e, por esse motivo, decidiu-se realizar a mesma análise com os conjuntos de amostras das cervejas produzidas com 45% de milho e 45% de arroz com o intuito de verificar o comportamento das amostras de outras produções frente ao método estabelecido. Essas análises demonstraram que os três conjuntos de amostras se comportaram da mesma maneira. Observa-se na Figura 4.11 (a), que após o sétimo dia de fermentação, quando a temperatura é reduzida para que seja realizada a maturação fria, os pontos diários começaram a se agrupar.

Esse comportamento indica que a partir do 7º dia de produção das cervejas de baixa fermentação, pode-se considerar que não existem grandes mudanças de composição da mesma. Observa-se pelo gráfico de *loadings* (Figura 4.11 b) que os sinais referentes aos açúcares estão posicionados na região com maior valor positivo da PC1, onde no gráfico de *scores* (Figura 4.11 a) encontram-se as amostras do início

do processo fermentativo. Essa relação acontece porque o processo fermentativo ainda se encontra no início e as amostras ainda contêm uma quantidade grande de açúcares. Por outro lado, na região negativa da PC1 do gráfico de *loadings* encontram-se o ácido pirúvico, o ácido acético e o ácido succínico, que são substâncias oriundas das vias metabólicas das leveduras que estão relacionados com as amostras do final do processo de fermentação, que conseqüentemente se encontram no gráfico de *scores* na região negativa. Este resultado exemplifica o processo fermentativo acompanhado por RMN e análises quimiométricas.

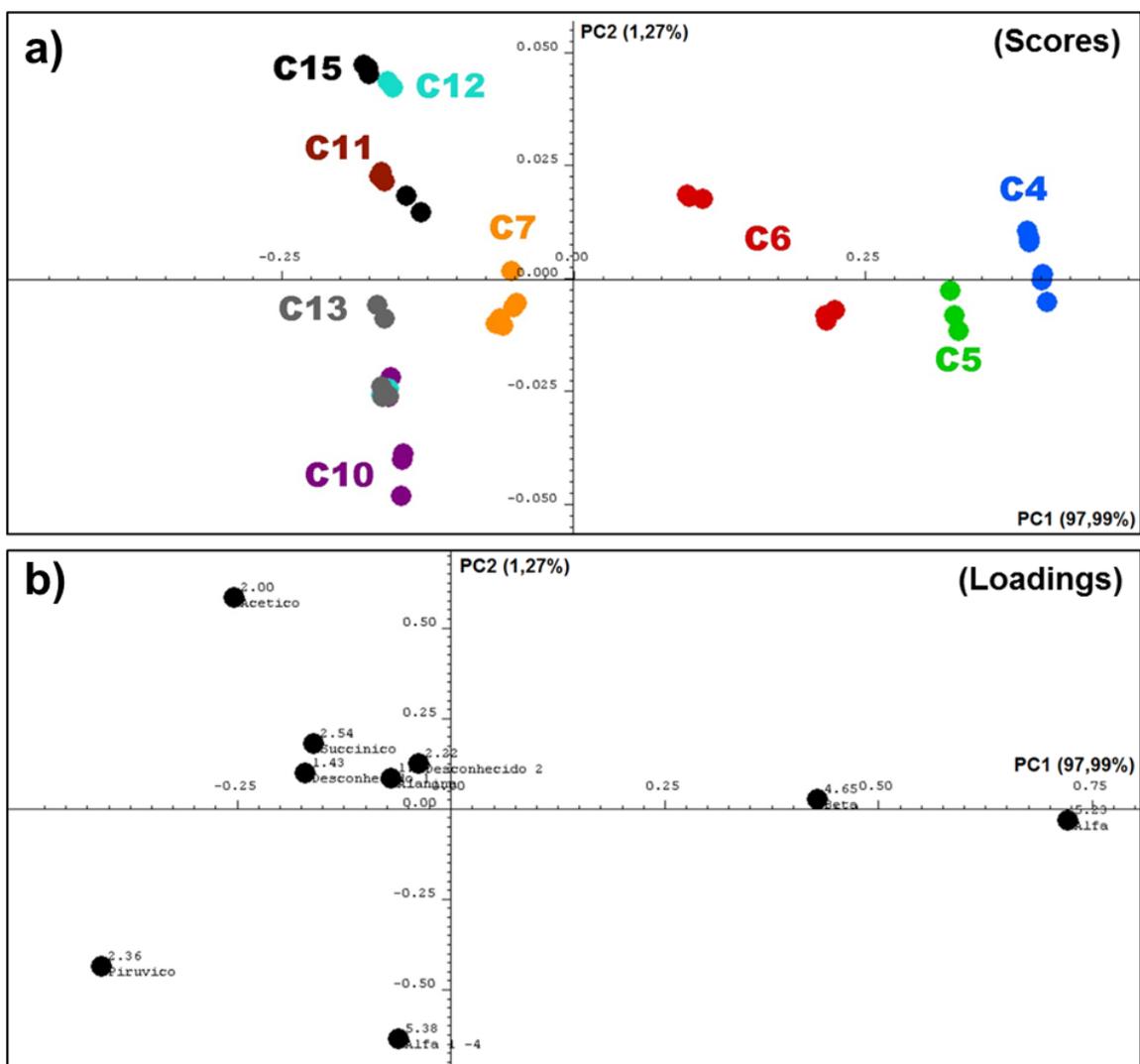


Figura 4.10 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 55% malte de cevada e 45% de milho como fonte de amido. Em (a) encontra-se o gráfico de *scores* e em (b) encontra-se o gráfico de *loadings*. No gráfico de *scores* C4 significa 4º dia da produção da cerveja, C5 significa 5º dia da produção da cerveja e assim sucessivamente até C15.

A partir desses resultados, realizou-se uma PCA com os espectros de RMN de ^1H das amostras dos dois últimos pontos de cinco produções com todas as réplicas, sendo as cervejas com 100% de malte e as produções com 30% e 45% de adjuntos. Nestas análises foram utilizados *buckets* variáveis para a montagem da *bucket table*, onde foram selecionados os sinais dos carbonos anoméricos dos açúcares, e também os sinais referentes a alanina, o ácido pirúvico, o ácido succínico e a acetona, sendo que esta análise foi realizada tanto com os dados não escalonados quanto escalonados. Os resultados entre as análises com e sem escalonamento dos dados foram similares e estão apresentados os gráficos da análise escalonada na Figura 4.11.

Comparando-se a formação dos grupos e a importância de cada substância para deslocar o grupo para uma determinada região, nota-se que a alanina foi importante para alocar o grupo de amostras de cerveja produzidas apenas com malte de cevada para a região negativa da PC1. Enquanto os grupos alocados na região positiva da PC2 foram influenciados pela presença do ácido pirúvico e as amostras da produção com 45% de arroz apresentou maior quantidade de ácido succínico (Figura 4.11).

Pode-se observar na Figura 4.11 (b) que a alanina se localiza na região negativa da PC1, do lado oposto de onde se encontram as amostras das produções com 30% e 45% de flocos arroz na Figura 4.11 (a). Essa análise demonstrou que é possível distinguir as amostras referentes a cada produção aplicando a análise de componentes principais a partir de uma região específica do espectro de RMN de ^1H .

Na Figura 4.12, verifica-se que a análise de componentes principais retratou fielmente o comportamento das amostras, pelo fato de que à medida que a quantidade de flocos de arroz aumenta nas produções de cerveja, a quantidade de alanina diminui.

O resultado combinado das análises quimiométricas e da avaliação do perfil químico obtidos nos espectros de RMN mostraram que apesar de sutil, existem diferenças nos espectros de RMN de ^1H que são observáveis utilizando pouca quantidade de amostras (2 mL considerando a triplicata) com um método de análise onde o preparo de amostra é mínimo.

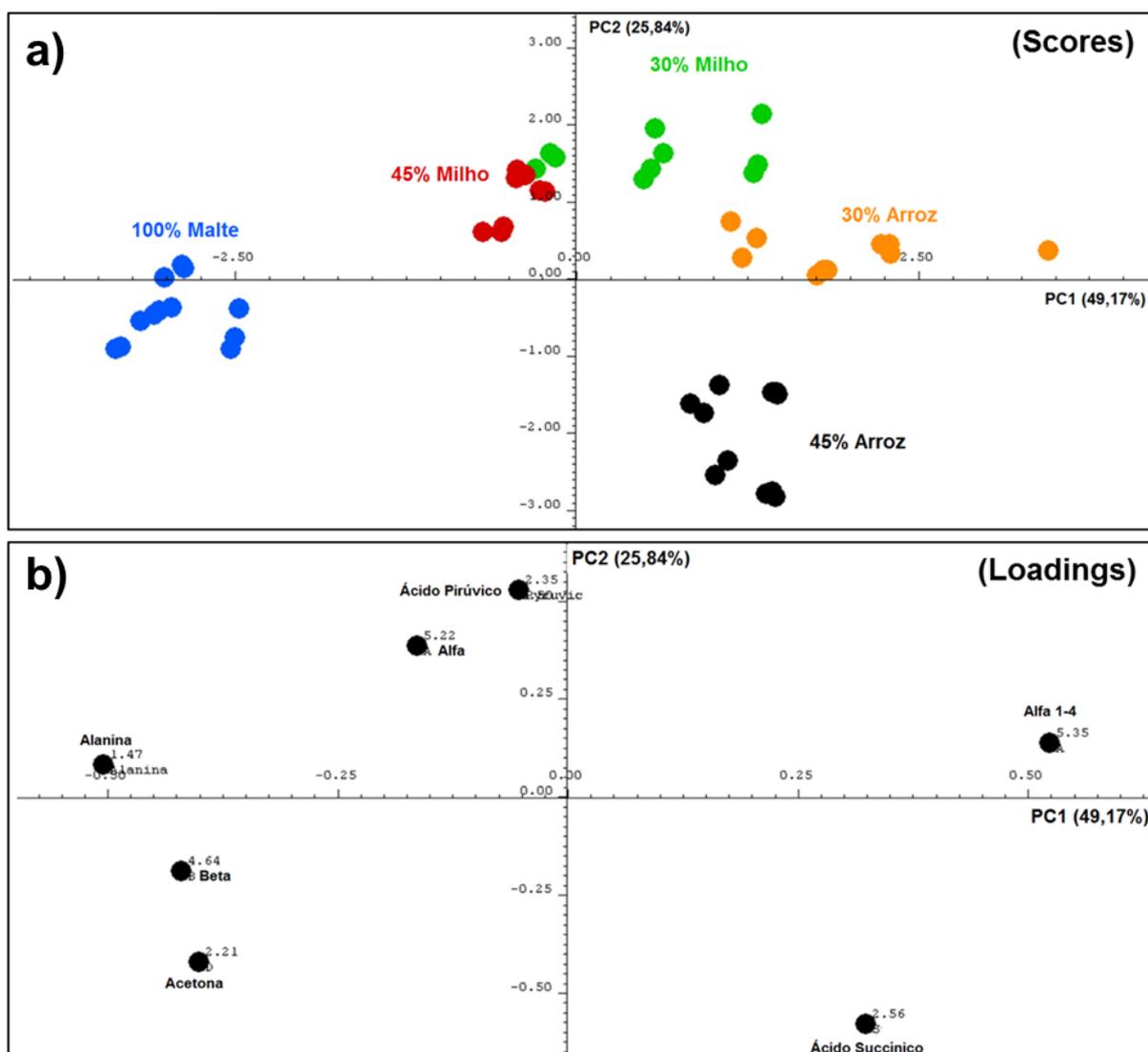


Figura 4.11 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 100% de malte de cevada, 30% e 45% de adjuntos, utilizando uma região específica dos espectros de RMN de ^1H . Em (a) está apresentado o gráfico de *scores* e em (b) está apresentado gráfico de *loadings*.

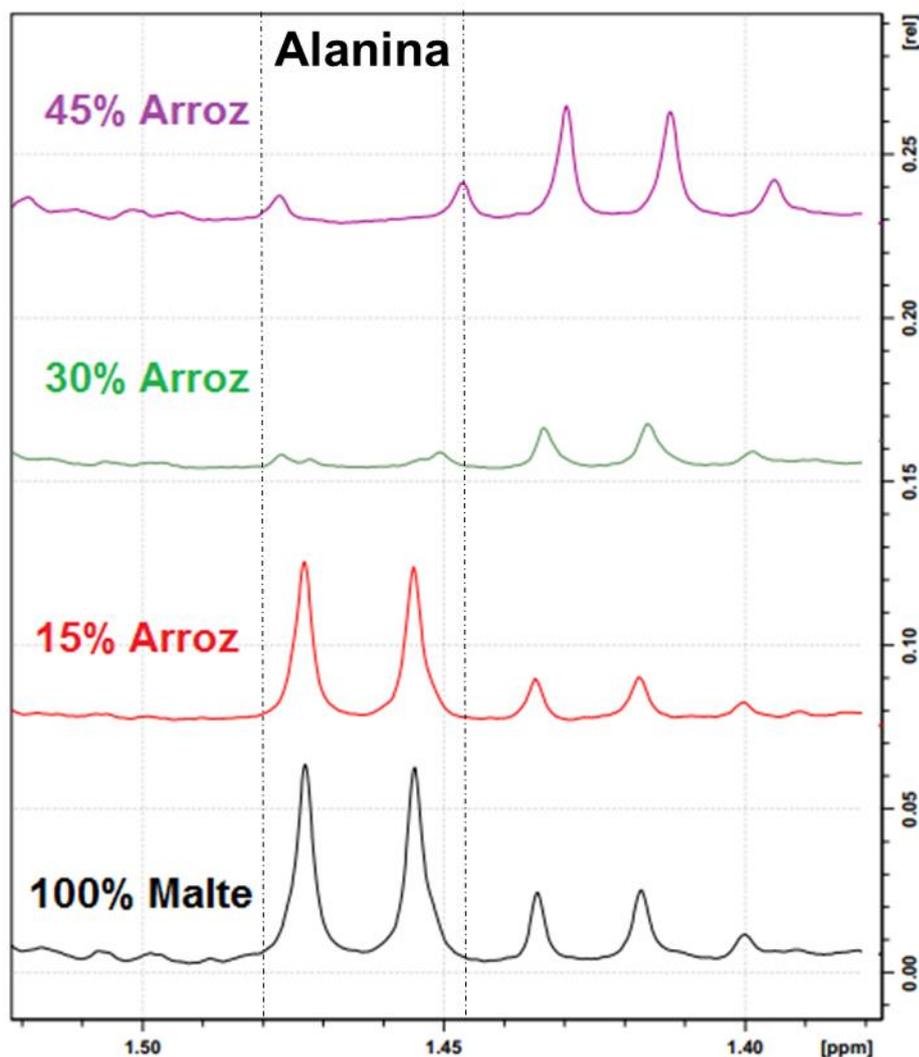


Figura 4.12 – Variação da quantidade de alanina nas cervejas produzidas com flocos de arroz, observada nos espectros de RMN de ^1H obtidos como a sequência de pulsos NOESYGPPR1D em D_2O .

Os resultados anteriores foram promissores quando se avaliou apenas uma região restrita do espectro, portanto, verificou-se a possibilidade de se obter os mesmos resultados em uma análise com o todo perfil do espectro de RMN de ^1H .

Utilizando os mesmos espectros das análises anteriores, foi realizada uma PCA do perfil dos espectros de RMN de ^1H obtidos utilizando a sequência de pulso NOESYGPPR1D. Foram excluídas as regiões com deslocamento químico maiores que 10,00, menores que 1,39 e entre 5,19 até 4,70 ppm. Para análise do perfil, foram utilizados *buckets* simples de 0,04 ppm e os dados foram escalonados. O resultado desta análise também mostrou a distinção das amostras, como observado na Figura 4.13.

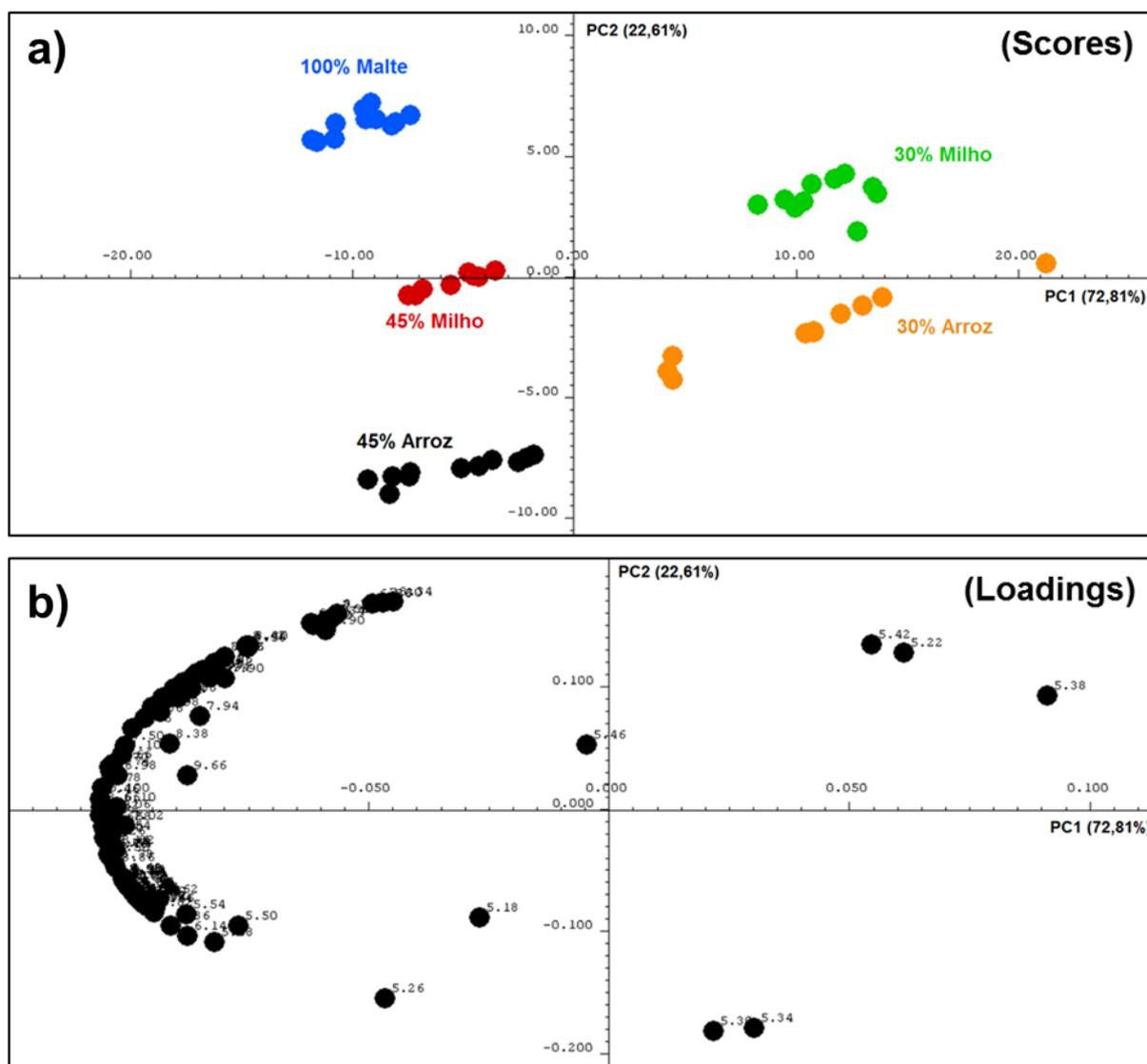


Figura 4.13 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 100% malte de cevada, 30% e 45% de adjuntos como fonte de amido, utilizando o perfil dos espectros de RMN de ^1H . Em (a) está apresentado o gráfico de *scores* e em (b) está apresentado gráfico de *loadings*.

Este resultado demonstrou que é possível separar as amostras de cervejas produzidas com até 30% de adjuntos seguindo o protocolo de análise desenvolvido. Apesar da separação dos grupos as amostras com 45% de adjuntos estão mais próximas das amostras da produção feita com 100% de malte, a princípio esse não seria o comportamento esperado.

Contudo, essa separação é correlacionada ao perfil químico obtido no espectro de RMN de ^1H que está diretamente correlacionado com as substâncias presentes em

cada amostra. Deste modo, as amostras foram distinguidas pelo perfil, indicando que existem diferenças entre substâncias presentes nas cervejas produzidas com diferentes fontes de amido ou que existe variação nas proporções entre as substâncias. Em alguns casos, não foi possível identificá-las, como exemplo na região de açúcares onde há grande sobreposição dos sinais na região de 4,30 a 3,20 ppm.

Em seguida, foram inseridas mais amostras no modelo, com a inclusão das amostras das produções que utilizaram 15% de adjuntos como fonte de amido. Também decidiu-se utilizar a região dos compostos alifáticos.

Na análise das amostras com as cervejas produzidas com 15%, 30% e 45% de adjuntos, foram utilizados somente os dois últimos pontos referentes a cada produção e as suas replicatas. Para a montagem da *bucket table* utilizou-se *buckets* variáveis para selecionar somente os sinais de interesse e os dados foram escalonados. O resultado desta análise está demonstrado na Figura 4.14, em (a) as amostras das produções com 15% de adjuntos não se agruparam próximas aos grupos com 30% e 45%, mas se agruparam próximas ao grupo de cervejas produzidas apenas com malte de cevada. Na Figura 4.14 o gráfico de *scores* (a) associado ao gráfico de *loadings* (b), mostram que a alanina, o ácido pirúvico e o ácido succinico são as substâncias responsáveis por distinguir os grupos das amostras na PCA em PC1 x PC2.

O ácido pirúvico e o ácido succinico são metabólitos produzidos nas vias metabólicas das leveduras, especificamente o ácido pirúvico é produzido na via da glicólise e o ácido succinico no ciclo do ácido cítrico. Partindo do pressuposto que as cervejas são diferenciadas devido à esses metabólitos, gera-se a hipótese que as leveduras que cresceram e se desenvolveram em mostos que continham substâncias distintas ou em diferentes quantidades, que podem ser entendidos como substratos diferentes. Desta maneira a levedura foi induzida a produzir os metabólitos em quantidades distintas entre as produções, gerando variação de concentração dos metabólitos nas cervejas e conseqüentemente a distinção das amostras nas de PCA.

As separações também ocorreram devido aos aminoácidos, presentes desde a produção do mosto. A levedura consome parte desses aminoácidos, porém eles continuam presentes em algumas cervejas, como foi mostrado no caso da alanina. Essa variação está diretamente ligada à fonte de amido para produção do mosto e influência na distinção das amostras na análise de PCA.

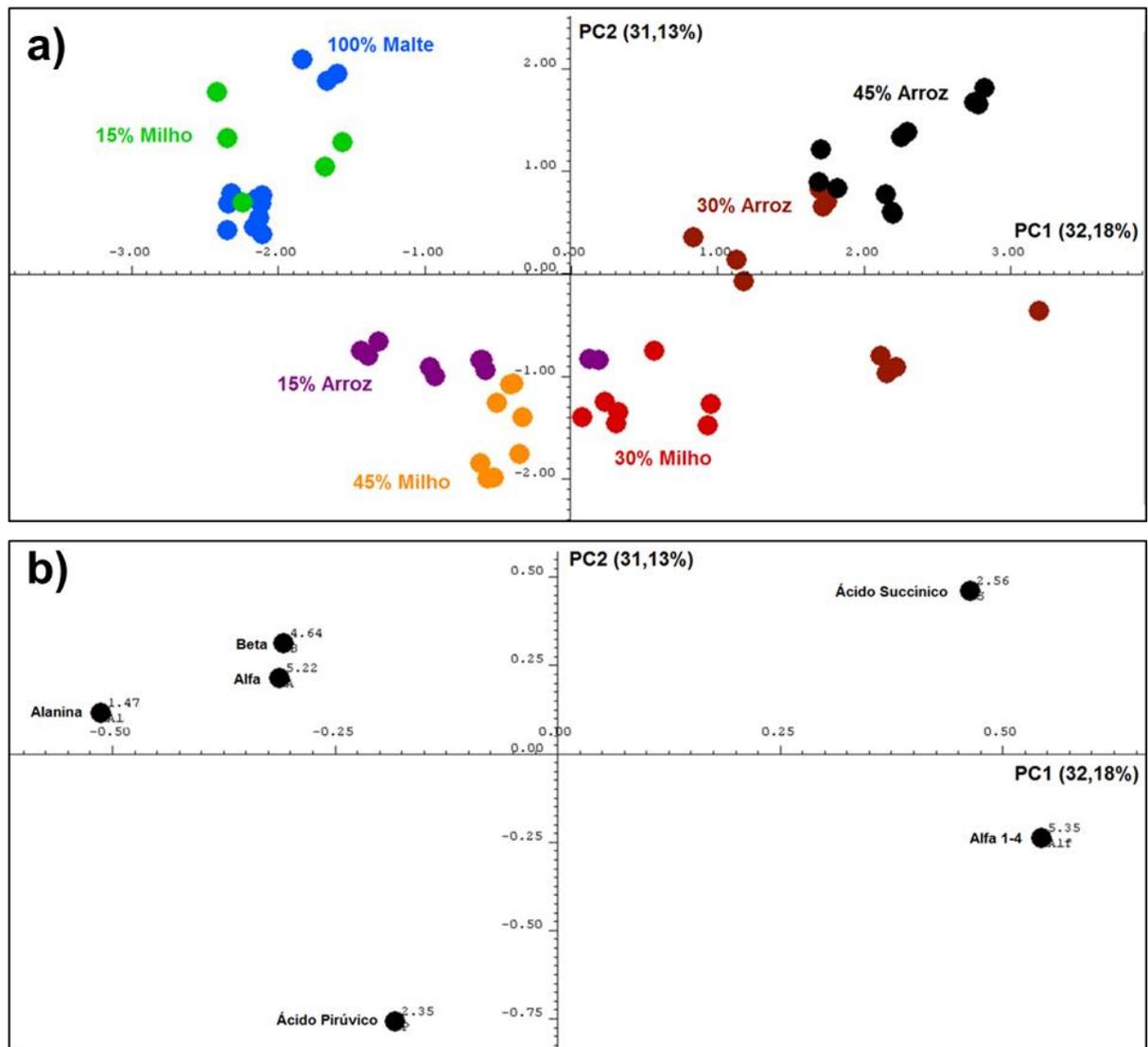


Figura 4.14 – Gráfico de PCA das amostras de cerveja produzidas com 100 % de malte de cevada, 15% de adjuntos, 30% de adjuntos e 45% de adjuntos como fonte de amido. Em (a) está apresentado o gráfico de *scores* e em (b) está apresentado gráfico de *loadings*.

CAPÍTULO 5

Conclusões

5. CONCLUSÕES.

Os resultados obtidos neste trabalho levam às seguintes conclusões:

- 1) Aplicando a metodologia desenvolvida é possível distinguir as amostras de cervejas produzidas com 30% ou mais de grãos de milho ou flocos de arroz como fonte de amido alternativa ao malte de cevada, sendo que as substâncias: ácido pirúvico, o ácido succínico e a alanina foram as principais responsáveis pela discriminação.
- 2) A análise do perfil metabólico pela RMN de ^1H das amostras de mosto e de cervejas produzidos em laboratório revelou a variação da intensidade dos sinais na região dos açúcares e dos compostos alifáticos que estão relacionados a etapa produtiva da cerveja, tornando possível a distinção das etapas produtivas.
- 3) O trabalho realizado indica que é possível desenvolver modelo quimiométrico no qual será possível a comparação de cervejas produzidas em laboratório com as cervejas comerciais, sendo que o intuito dessa comparação seria verificar a quantidade de arroz e milho utilizados na produção das cervejas.

5.1 Proposta de trabalho futuros

Os resultados sugerem que os próximos trabalhos nesta área devem utilizar métodos de separação para avaliar as frações das amostras separadamente, pois é possível que outras substâncias que sejam capazes de distinguir os conjuntos de amostra não tenham sido identificadas devido à sobreposição de sinais. Também é provável que o uso de análises de RMN quantitativo também possam gerar resultados relevantes neste futuro trabalho.

Os resultados obtidos foram coletados de produções com grãos de malte de cevada, grãos de milho e flocos de arroz. Também é sugerido para próximos trabalhos, avaliar produções a partir dos extratos destes grãos, a fim de afirmar se o comportamento dos resultados se repetem nessas condições.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº65, de 10 de Dezembro de 2019. Disponível em: <http://www.in.gov.br/web/dou/-/instrucao-normativa-n-65-de-10-de-dezembro-de-2019-232666262>. Acesso em 23 março 2020.
2. Brasil. Disponível em < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2019-2022/2019/Decreto/D9902.htm#art2>. Acesso 25 de Novembro de 2019.
3. MORADO, R. **Larousse da Cerveja**. São Paulo: Editora Lafonte Ltda., p. 20 – 32, 2009.
4. LARANJEIRA, R.; PINSKY, I.; SANCHES, M.; ZALESKI, M.; CAETANO, R. Alcohol use patterns among Brazilian adults. **Rev. Bras. Psiquiatr.** v. 32, nº 3, p. 231 – 241, set. 2010.
5. Clube do Malte. Disponível em <<http://blog.clubedomalte.com.br/curiosidades-mercejeiras/5-maiores-produtores-de-merceja-do-mundo/>>. Acesso em 30 de abril de 2020.
6. MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. **A Cerveja no Brasil: O ministério da agricultura informando e esclarecendo**. Ministério da Agricultura, 2017.
7. Cerv Brasil. Disponível em <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf>. Acesso 30 de abril de 2020.
8. MARCUSSO, E. F.; MULLER, C. V. **Anuário da Cerveja 2019**. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, p 1 -16, 2020.
9. UOL. Disponível em <<https://comidasebebidas.uol.com.br/noticias/redacao/2012/09/12/popular-a-merceja-pilsen-e-a-porta-de-entrada-para-o-mundo-da-mercejas-conheca-esta-e-outros-estilos.htm>>. Acesso 30 de abril de 2020.
10. 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. **Cienc. Technol. Aliment.** v. 23(2), p 121-128, ago. 2003.

11. Brewers Association. Disponível em: <<https://www.brewersassociation.org/resources/brewers-association-beer-style-guidelines/>>. Acesso em 03 de maio de 2020.
12. Beer Judge Certification Program (BJCP). Disponível em: <<https://www.bjcp.org/>>. Acesso em 03 de maio de 2020.
13. PALMER, J. J; KAMINSKI, C. Water: A comprehensive Guide for Brewers Guide to Beer Fermentation. Colorado: **Brewers Publications**, p 18 – 136, 2013.
14. Tecnologia Cervejeira / Senai, agraria, Centro de Tecnologia SENAI alimentos e bebidas – Rio de Janeiro, p. 10 – 250, 2014.
15. DURELLO, R. S. Química do sabor de cervejas: detalhes moleculares de lúpulos (*Humulus lupulus*) cultivados no Brasil no processo cervejeiro. São Carlos, 2019.
16. BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Brewing Science and practice. Woodhead Publishing Limited, p. 227 - 324 2004.
17. PALMER, J. J. How to brew: Everything you need to know to brew beer right the first time. **Brewers Publications**, p. 60 – 235, 2006.
18. WHITE, C; ZAINASHEFF, J. Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation. Colorado: **Brewers Publications**, p. 5 – 118, 2010.
19. Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP). Disponível em <<https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20200312130632-boletimmilhomarco2020/>>. Acesso 23 de Março de 2020.
20. Atlas socioeconômico Rio Grande do Sul. Disponível em <<https://atlassocioeconomico.rs.gov.br/arroz>>. Acesso em 23 de Março de 2020.
21. DANIELS, R. Designing Great Beers: The Ultimate Guide to Brewing Classic Beer Styles. Colorado: **Brewers Publications**, p. 30 – 147, 1996.
22. HORNINK, G. G., GALEMBECK G. **Glossário cervejeiro: da cultura à ciência**. Alfenas – MG: Editora Universidade Federal de Alfenas, p. 18 2019.

23. BOKULICH, N. A.; BAMFORTH C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. **MMBR**. v. 77, n. 2, p. 157-172. Jun. 2013.
24. Encyclopledia Britannica. Disponível em <<https://www.britannica.com/technology/pasteurization>>. Acesso 25 de abril de 2020.
25. ELIASSON, A.C. **Carbohydrates in food**. New York: Taylor & Francis Group, ed. 3, p. 378, 2017.
26. DENARDIN, C.C.; SILVA, L.P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Ciência Rural**, v. 39, p. 945–954, mai-jun. 2009.
27. ABLETT, S. Overview of NMR application in food science. **Trends Food Sci. Technol**, v. 3, p. 246-250, 1992.
28. BOFFO, E. F. Utilização da RMN aliada a métodos quimiométricos na análise de méis e aguardentes. São Carlos, Programa de Pós Graduação em Química – UFSCar, 2009. Tese de Doutorado, p 115.
29. CHRISTOPH, N.; HERMANN, A.; WACHTER, H. 25 Years authentication of wine with stable isotope analysis in the European Union – Review and outlook. 38º World Congress of Vine and Wine, 2015.
30. ALMEIDA C.; DUARTE I. F.; BARROS A.; RODRIGUES J.; SPRAUL M.; GIL A. M. Composition of Beer by ¹H NMR Spectroscopy: Effects of Brewing Site and Date of Production. **J. Agric. Food Chem**. v. 54, Nº 3, p 700-706, 2006.
31. BELLOQUE, J.; RAMOS, M. Application of NMR spectroscopy to milk and dairy products, **Trends Food Sci. Technol**, v. 10 p. 313-320, out.1999.
32. CONSONNI, R.; CAGLIANI, L. R. Ripening and geographical characterization of Parmigiano Reggiano cheese by ¹H NMR spectroscopy. **Talanta**, v. 76, p. 200–205, mar. 2008.
33. VOGEL, H.; LUNDBERG, P.; FABIANSSON, S.; RUDERUS, H.; TORNBERG, E. Post-mortem energy metabolism in bovine muscles studied by non-invasive phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **Meat Science**, v. 13, p. 1-18, 1985.
34. HONG E.; LEE S. Y.; JEONG, J. Y.; PARK J. M.; KIM B. H.; KWON K.; CHUN H. S. Modern analytical methods for the detection of food fraud and adulteration by food category. **J. Sci. Food Agric.**, v. 97, p. 3877-3896, abr. 2017.

35. LE GALL, G. PUAUD, M.; COLQUHOUN, I. J. Discrimination between orange juice and pulp wash by ¹H nuclear magnetic resonance spectroscopy: identification of marker compounds. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, p. 580–588, jan. 2001.
36. DUARTE, I.; BARROS, A.; BELTON, P.S.; RIGHELATO, R.; SPRAUL, M.; HUMPFER, E.; GIL, A.M. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, p. 2475–2481, 2002.
37. LACHENMEIER, D.W.; FRANK, W.; HUMPFER, E.; SCHAFER, H.; KELLER, S.; MORTTER, M.; SPRAUL, M. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 220, p. 215–221, dez. 2005.
38. HATZAKIS, E. Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy in Food Science: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v. 18, p. 189-220, 2019.
39. PEREIRA, P. C. S.; FREITAS, C. F.; CHAVES, C. S.; ESTEVÃO, B. M.; PELLOSI, D. S.; TESSARO, A. L.; BATISTELA, V. R.; SCARMINIO, I. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N. A Quimiometria nos cursos de graduação em química: proposta do uso da análise multivariada na determinação de pKa. **Química Nova**. v. 37, n. 8, p. 1417-1425, 2014.
40. FERREIRA, M. M. C. **Quimiometria - Conceitos, Métodos e Aplicações**. Campinas: Editora Unicamp, p 90 – 116, 2015.
41. HELFER, G. A.; BOCK, F.; MARDER, L.; FURTADO, J. C.; COSTA, A. B.; FERRÃO, M. F. Chemostat, um software gratuito para análise exploratória de dados multivariados. **Quím. Nova**. São Paulo, v. 38, n. 4, p. 575-579, Maio, 2015.
42. The Human Metabolome Database. Disponível em <hmdb.ca>. Acesso em 09 de Junho de 2020.
43. Yeast Metabolome Database. Disponível em <yMDB.ca>. Acesso em 09 de Junho de 2020.
44. Chenomx – NMR Mixture Analysis. Disponível em <<https://www.chenomx.com>>. Acesso em 09 de Junho de 2020.