

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

**Técnicas espectroscópicas aplicadas a cerveja: estudo do processo  
de brassagem do malte tipo Pilsen e caracterização do efeito  
*gushing* primário**

Francylaine Silva de Almeida

Dourados – MS

Fevereiro/2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE DOURADOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS

**Técnicas espectroscópicas aplicadas a cerveja: estudo do processo  
de brassagem do malte tipo Pilsen e caracterização do efeito  
*gushing* primário**

Francylaine Silva de Almeida

Prof. Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade

“Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Recursos Naturais, área de concentração em Recursos Naturais, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Recursos Naturais”.

Dourados – MS

Fevereiro/2017

A446t Almeida, Francylaine Silva de

Técnicas espectroscópicas aplicadas a cerveja: estudo do processo de brassagem do malte tipo Pilsen e caracterização do efeito *gushing* primário / Francylaine Silva de Almeida. Dourados, MS: UEMS, 2017.

131p. ; 30cm

Tese (Doutorado) – Recursos Naturais – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Dourados, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Luis Humberto da Cunha Andrade.

1.FTIR-ATR. 2. UV-Vis. 3. Espalhamento de luz dinâmica.  
I. Título.

CDD 23.ed. 543.0858

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.  
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”

Marthin Luther King

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por me amparar em todos os momentos. Louvo e glorifico a ti.

Aos meus pais Altair e Maria Aparecida pela educação, pelo empenho e apoio em todas as etapas dos meus estudos. Vocês sempre serão meus exemplos, de força, garra, dedicação, e de luta. Aos meus irmãos Francielle e Francy Helder, que são meus companheiros para toda hora. As minhas pequenas Mikaelly (irmã), Leticia e Larissa (sobrinhãs), que fazem do meu mundo mais alegre, em palavras da Larissa: “a tia é engraçada comigo”. AMO MUITO VOCÊS.

As minhas melhores amigas Natalia, Enedable, Sorraila e Camila Cristina que estão sempre presentes, por transformarem os momentos difíceis um pouco mais fácil.

Aos meus sogros Regiane e Aparecido, por todo apoio e pela disponibilidade em me ajudar. Aos meus cunhados queridos, Isabella e Rafael.

Aos meus amigos Mary e Alex que me acompanharam durante a graduação, mestrado e agora no doutorado. Agradeço muito pela amizade. Vou levá-los sempre em meu coração. Que nossa amizade continue existindo apesar da distância, que vira com o tempo.

Aos meus amigos, e não colegas, que tive a oportunidade de conviver durante os quatro anos de doutorado: Ana Kelly, Ana Paula, Claudio, Cristiane, Dinorah, Francine, Larissa, Rafaella, Simone, Thais, Warley. Aos ICs, Vitor, Guilherme e Paula. Apesar de não falar, levo cada um no coração. Todos de uma forma ou de outra me ajudaram. Admiro cada um. GEOF melhor grupo de pesquisa. Quero levar a amizade de vocês para sempre.

A Cinthia, técnica do CERNA, que me ajudou nas medidas e análises de dados de cromatografia, meu muito obrigada!

Ao professor Luis Humberto da Cunha Andrade por acreditar em meu potencial, e me dar a oportunidade de realizar o doutorado, e principalmente, pelos ensinamentos e paciência em me orientar. Aos professores Sandro Marcio Lima e Yzel Rondon Suárez pelos ensinamentos.

Aos professores Guy Derdelinckx e Hubert Verachtert por terem me acolhido em seu laboratório para desenvolver a pesquisa na Bélgica. Aos colegas de laboratório Karla

e David pela ajuda. Karla um anjo que tive a honra de conhecer, e mais que colega, uma amiga!

Aos colegas que tive o prazer de conhecer durante minha estadia na Bélgica. Felipi, Jully, Janaina, Livia, Willian, Mari, Sten, Amanda, Caio, Mayte, Ana Paula, Leticia, Marcelo, Ademir. Obrigada pelo apoio, e por transformarem meu 2016!

A CAPES por ter me financiado nesta empreitada. Ao CNPq pela oportunidade do doutorado-sanduiche.

RODRIGO, agradeço todos os dias por ter me escolhido para compartilhar a vida, por seu companheirismo, amor, carinho, **paciência** e dedicação. TE AMO MUITO!

# SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT .....	xi
CAPÍTULO 1- Considerações gerais .....	1
1.1- Introdução.....	1
1.2- Referências Bibliográficas .....	3
CAPÍTULO 2 – Caracterização Espectroscópica do processo de Brassagem utilizado na cerveja.....	5
2.1- Fundamentação teórica.....	5
2.1.1- Breve histórico da cerveja .....	5
2.1.2- Benefícios da cerveja.....	6
2.1.3- Matérias-primas e os processos de fabricação .....	7
2.1.3.1- Água .....	7
2.1.3.2- Malte.....	8
2.1.3.3- Adjuntos .....	9
2.1.3.4- Lúpulo .....	9
2.1.3.5- Levedura.....	10
2.1.3.6- Processos da fabricação de cerveja .....	11
2.1.4- Brassagem .....	16
2.1.5- Classificação da cerveja .....	22
2.1.6- Técnicas de análise da cerveja.....	25
2.2- Objetivo .....	26
2.3- Materiais e Métodos .....	27
2.3.1- Produção da Brassagem.....	27
2.3.2- Cromatografia líquida de alta eficiência .....	29
2.3.2- Medidas do °Brix.....	30
2.3.4- Índice de Refração Espectral .....	30

2.3.5- Absorção no Infravermelho Médio .....	33
2.3.6- Absorção molecular no Ultravioleta e Visível .....	34
2.3.7- Fluorescência de excitação e emissão óptica.....	35
2.4- Resultados e Discussão .....	37
2.4.1- Análises padrões do processo de brassagem da cerveja.....	37
2.4.1.1- Primeira Brassagem.....	37
2.4.1.2- Segunda Brassagem.....	41
2.4.1.3- Terceira Brassagem .....	43
2.4.2- Espectroscopia aplicada ao monitoramento da etapa de Brassagem	46
2.4.2.1- Absorção no Infravermelho médio.....	46
2.4.2.2- Absorção molecular no Ultravioleta e Visível .....	54
2.4.2.3- Índice de refração espectral .....	58
2.4.2.4- Fluorescência de excitação e emissão óptica .....	62
2.5- Conclusão .....	68
2.6- Referências Bibliográficas .....	70
 CAPÍTULO 3– Espalhamento de luz dinâmica para detectar o gushing primário da cerveja.....	 80
3.1- Fundamentação Teórica .....	80
3.1.1- Hidrofobinas- principal ativadora do gushing primário .....	82
3.1.2- Mecanismo que leva ao surgimento do gushing primário.....	83
3.1.3- Técnicas de detecção .....	89
3.1.4- Teoria sobre a técnica de Espalhamento de luz dinâmica.....	93
3.2- Objetivos .....	95
3.3- Materiais e Métodos .....	95
3.3.1- Produção de hidrofobina HFBII.....	95
3.3.2- Caracterização da interação de Hidrofobina com moléculas de CO <sub>2</sub> por DLS.....	96
3.3.3- Caracterização do processo de brassagem com DLS .....	98

3.4- Resultados e Discussão .....	99
3.4.1- Influência da variação de pressão na interação hidrofobina-CO <sub>2</sub> ....	99
3.4.2- Influência da concentração na interação hidrofobina-CO <sub>2</sub> .....	102
3.4.3- Detecção das partículas de interação hidrofobina-CO <sub>2</sub> em cervejas comerciais.....	103
3.4.4- Detecção de partículas no processo de brassagem .....	106
3.5- Conclusão .....	108
3.6- Referências Bibliográficas .....	108
CAPÍTULO 4- Considerações Finais .....	117

## RESUMO

A cerveja é uma bebida composta por água, malte (cevada malteada), lúpulo e levedura, na qual o amido extraído do malte é transformado em açúcar e posteriormente em álcool. A primeira parte do trabalho tem como objetivo monitorar o processo de brassagem, analisando a conversão do malte em açúcares e aminoácidos por técnicas espectroscópicas. Foram utilizadas três brassagens, a primeira seguindo as rampas de temperatura ótima para cada enzima atuante, na segunda utilizou-se três rampas de temperaturas típicas para produção de cerveja artesanal, e a terceira produzida de acordo com o estilo belga. Primeiramente, o processo foi monitorado em tempo real pelo teste de sacarificação do iodo, com o qual pode-se observar o momento em que a maioria do amido foi transformado em açúcares. As medidas de °Brix foram utilizadas para monitorar os níveis de açúcares presentes nos mostos produzidos. A primeira e segunda brassagem tiveram um nível bom para produção de cerveja tipo Lager, e a terceira, como era o intuito, teve menores valores indicado para cerveja belga. Para quantificar os açúcares presentes nas amostras utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência, sendo analisados quatro tipos de açúcares: maltose, dextrina, glicose e frutose. A primeira brassagem teve as maiores concentrações desses açúcares, comparados com as demais brassagens. A segunda brassagem e a terceira tiveram aproximadamente os mesmos índices de concentrações para maltose e dextrina. As amostras foram analisadas pelas técnicas de absorção no infravermelho médio, absorção no UV-Vis, índice de refração espectral, e fluorescência excitação e emissão. A absorção no infravermelho médio mostrou-se eficiente na caracterização dos açúcares presentes no mosto, a absorção da maltose e da dextrina foram fatores importantes para o monitoramento dos processos. A absorção no ultravioleta-visível apresentou as bandas de absorção dos aminoácidos e da vitamina B, utilizando as intensidades dessas bandas aplicando o método de análise discriminante revelou que se pode distinguir as rampas que produziram principalmente aminoácidos em todas as brassagens. A técnica do índice de refração espectral mostrou-se eficiente nas distinções entre os conjuntos de curvas das brassagens. Com a técnica de excitação e emissão observa-se o comportamento dos compostos aminoácidos, vitamina B e polifenóis presentes nos diferentes processos. Todas as técnicas espectroscópicas utilizadas se mostraram eficientes tanto no monitoramento dos açúcares e aminoácidos, quanto para a caracterização das amostras revelando outros compostos presentes durante

a brassagem. A segunda parte do trabalho teve objetivo de aplicar a técnica de espalhamento de luz dinâmica para detectar a nanoestruturas formadas pela interação da proteína hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub> que são promovedoras do efeito *gushing* primário. Primeiramente analisou-se o efeito da pressão no tamanho das partículas, confirmando que estas nanoestruturas são menores conforme a pressão aumenta. Analisou-se a influência da concentração das hidrofobinas à 4atm, sendo constatado que a quantidade de *gushing* primário cresce de acordo com a concentração, porém o tamanho da partícula é constante (60nm). Cervejas comerciais foram testadas induzindo o *gushing* pelas hidrofobinas e apresentaram as mesmas partículas promovedoras do efeito.

Palavras-chave: FTIR-ATR, UV-Vis, índice de refração espectral, fluorescência de excitação e emissão, espalhamento de luz dinâmica.

## ABSTRACT

Beer is a beverage made up of water, malt (malted barley), hops and yeast, in which the starch extracted from the malt is transformed into sugar and then into alcohol. The first part of this work aims to monitor the process of mashing, analyzing the conversion of malt into sugars and amino acids by spectroscopic techniques. Three mashing processes were used, the first following the temperature steps for each active enzyme, the second one used three typical temperature steps for classical mashing, and the third one produced according to the Belgium style, with only two temperature steps. First, the process was monitored in real time by the iodine saccharification test. With this test, it is possible to observe the moment when most starch was transformed into sugars. °Brix measurements were used to monitor the levels of sugars present in the produced wort. The first and second mashing had an appropriate level for Lager beer production; and the third, as it was intended, had lower values indicated for Belgian beer. To quantify the sugar presents in the samples, high performance liquid chromatography was used, and four types of sugars were analyzed: maltose, dextrin, glucose and fructose. The first mashing had the highest concentrations of these sugars compared with other mashing. Second and third mashing had same concentrations of maltose and dextrin. The samples were analyzed by the techniques of absorption in the medium infrared, absorption in the UV-Vis, spectral refractive index, and excitation and emission. The absorption in the medium infrared was efficient in the characterization of sugars present in the wort, the absorption of maltose and dextrin were crucial factors for the monitoring of the processes. UV-Vis absorption showed the bands of absorption of amino acids and vitamin B, using the intensities of these bands applying the discriminant analysis method revealed that it is possible to discern between the step that occur production of aminoacids and the others, in all type mashing. The spectral refractive index technique proved to be efficient in the distinctions of the groups of mashing. Excitation and emission fluorescence technique showed the behavior of the amino acids, vitamin B and polyphenols present in the different processes. All the spectroscopic techniques used proved to be efficient both for the monitoring of sugars and amino acids and for the characterization of the samples revealing other compounds present during the mashing. The second part of this work had aim of applying the dynamic light scattering technique to detect the nanostructures formed by the interaction of the hydrophobin protein and CO<sub>2</sub> molecules that are

promoting the primary *gushing*. First, the effect of pressure on particle size was analyzed, confirming that these nanostructures are smaller as the pressure increases. The influence of concentration of the hydrophobins at 4 atm was verified, being that the amount of primary *gushing* increase according to the concentration, however the particle size is constant (60 nm). Commercial beers were tested inducing *gushing* by the hydrophobins and presented the same particles that cause this effect.

Key-word: FTIR-ATR, UV-Vis, spectral refractive index, excitation and emission fluorescence, dynamic light scattering.

# **CAPÍTULO 1- Considerações gerais**

## **1.1- Introdução**

A cerveja é uma bebida composta por água, malte (cevada malteada), lúpulo e levedura, na qual o amido extraído do malte é transformado em açúcar e posteriormente em álcool (SINDCERV). Acredita-se, que tenha sido a primeira bebida alcoólica desenvolvida pelo homem. Esta bebida é considerada um alimento quase completo, pois possui grande valor nutritivo, por exemplo um litro de cerveja proporciona de 400 a 450 kcal, o que corresponde a 1/6 das necessidades calóricas diárias para um adulto (CERVESIA, 2013). Além disso, esta bebida é facilmente assimilada pelo organismo e os benefícios gerados a saúde, quando ingerida com moderação, são inúmeros (De GAETANO et al., 2016).

O mercado cervejeiro é o que mais cresce no mundo, movendo bilhões de dólares na economia. No Brasil, a indústria cervejeira é um dos motores da economia em diversos estados. A sua contribuição se estende desde os que possuem o cultivo da cevada até as cidades onde as fábricas estão instaladas. A prosperidade dessa indústria tem impacto direto no desenvolvimento dessas localidades e, conseqüentemente, do Brasil. Esta indústria colabora em diversos setores como agropecuária, indústria de transformação, transportes e comunicações, comércio varejista e atacadista, entretenimento e turismo (CERVEJA E BRASIL). Além de contribuir com a economia, a indústria brasileira de cerveja conquistou lugar de destaque no cenário internacional, com empresas nacionais fazendo parte de grandes conglomerados de atuação global. Este segmento também trabalha para mitigar o impacto do seu negócio no meio ambiente, desenvolvendo ações voltadas para uma atuação mais sustentável e estimulando o consumo responsável de seus produtos (CERVEJA E BRASIL).

O Brasil está entre os maiores consumidores de cerveja, mas não possui destaque em números de indústrias cervejeiras, sendo que a atual demanda é atendida por indústrias como a Ambev, Schincariol e Petrópolis. Porém, nos últimos anos, o mercado cervejeiro teve um novo rumo, com o surgimento das cervejas artesanais, sendo fabricada por microcervejarias, e atendendo a demanda de cervejas especiais e diferentes das tradicionais Pilsen. Desta forma, é importante o desenvolvimento de estudos que envolvam os processos e controle da fabricação deste produto.

A maioria dos trabalhos publicados (artigos indexados) exploram a análise de cervejas utilizando a cromatografia, tanto líquida quanto gasosa, como metodologia, se tornando uma técnica padrão de análise (ASBC, 2016). Entretanto, as técnicas espectroscópicas vêm sendo exploradas e demonstram ser uma excelente ferramenta na caracterização deste produto (INÓN et al., 2006; LACHENMEIER, 2007). Estas técnicas apresentam algumas vantagens, como a alta sensibilidade, o custo de preparação de amostra é baixo, sendo que algumas nem precisa de preparação, e as medidas podem ser feitas em segundos em algumas análises.

A primeira parte deste trabalho (Capítulo 2) tem como objetivo acompanhar os processos que ocorrem durante a etapa de brassagem, que consiste em transformar o amido do malte em açúcares e proteínas utilizando rampas de temperaturas controladas. Utilizar rampas de temperaturas adequadas é essencial para o processo, pois para a conversão do amido é necessário ativar termicamente as enzimas presentes no malte. A brassagem é uma das etapas fundamentais para o processo de fabricação de cerveja, pois é dela que provem os nutrientes que alimentarão as leveduras que transformará os açúcares em álcool. Existem diferentes metodologias de brassagens, como por exemplo método de infusão ou múltiplas rampas. Cada tipo de brassagem é feita com o objetivo de priorizar a ação enzimática de determinadas enzimas mudando temperaturas e tempos de repouso, sendo obtido açúcares específicos que determinará as características do produto final. Foram analisados três diferentes tipos de brassagem com metodologia de múltiplas rampas, a primeira seguindo temperaturas ótimas de ativação de cada enzima atuante na conversão do amido em açúcares e proteínas, a segunda utilizando rampas de temperatura comumente utilizada para fabricação de cerveja Pilsen, e a terceira utilizando o método de rampas para fabricação de cerveja belga. Neste trabalho, os processos de brassagem foram monitorados primeiramente por técnicas padrões, que são utilizadas frequentemente na indústria e nas microcervejarias, sendo cromatografia líquida de alta eficiência, teste de sacarificação do iodo, e medida de °Brix. As técnicas espectroscópicas foram aplicadas também para o monitoramento destas brassagens, sendo utilizado as seguintes técnicas: absorção óptica no infravermelho médio, absorção no ultravioleta-visível, fluorescência de excitação e emissão, e índice de refração espectral.

A segunda parte (Capítulo 3) foi desenvolvida na Bélgica onde foi estudado o problema do *gushing* primário, descrito como uma expulsão do líquido de forma espontânea e violenta ao abrir uma garrafa de cerveja. Este fenômeno ocorre devido a contaminação do malte, por uma proteína chamada hidrofobina, que perdura durante o

processo de fabricação e ao interagir com moléculas de CO<sub>2</sub> causa o efeito *gushing*. Estudos prévios revelaram que a interação desta proteína com o CO<sub>2</sub> gera nanobolhas que permanecem estáveis dentro do líquido até que a garrafa seja aberta, quando isso ocorre as ligações entre eles se rompem liberando energia e ocasionando locais de nucleação que dá origem a forte expulsão do líquido, denominado *gushing* primário (DECKERS et al., 2012). O tamanho destas nanobolhas é dependente da pressão e temperatura, pois a molécula de CO<sub>2</sub> interage com a hidrofobina como se esta fosse um contaminante, e em um líquido saturado o diâmetro crítico das bolhas de CO<sub>2</sub> contaminadas dependem da pressão. Assim, estudos revelaram que as nanoestruturas da interação hidrofobina-CO<sub>2</sub> tem diâmetro de aproximadamente 100 nm à pressão atmosférica (DECKERS et al., 2011). Desta forma, este trabalho teve como objetivo detectar a nanoestruturas formadas pela interação hidrofobina-CO<sub>2</sub> por meio da técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS- dynamic light scattering) à pressão de 4 atm, a qual é a pressão que normalmente se encontra dentro de uma garrafa de cerveja. Neste estudo, foram detectadas as nanoestruturas devido a variação de pressão, e a dependência com a concentração das hidrofobinas. Ainda, utilizou-se cervejas comerciais, as quais foram introduzidas hidrofobinas para induzir o *gushing* primário, e sendo detectado o efeito, aplicou-se a técnica de DLS para medir o tamanho das partículas da interação hidrofobina-CO<sub>2</sub>. Além disso, a técnica de DLS foi aplicada para monitoramento e detecção das hidrofobinas no processo de brassagem. Para tanto se fez a comparação entre a brassagem produzida com o malte contaminado pela proteína, e a produzida com malte sem contaminação.

## 1.2- Referências Bibliográficas

ASBC. **Methods of analysis**, 2016. Disponível em: < <http://methods.asbcnet.org/toc.aspx> >. Acesso em: 23 jan. 2017

CERVEJA E BRASIL. **Impacto econômico da cerveja no Brasil**. Pesquisa realizada pela FGV e SINDICERV. Disponível em: < <http://www.cervejaebrazil.com.br/CervejaDoBrasil.aspx> >. Acesso em: 20 jan. 2017.

CERVESIA. **Cerveja e Saúde**. 2013. Disponível em: < <http://www.cervesia.com.br/> >. Acesso em: 20 jan. 2017.

DECKERS, S.M., LORGUILLOUX, Y., GEBRUERS, K., BAGGERMAN, G., VERACHTERT, H., NEVEN, H., MICHIELS, C., DERDELINCKX, G., DELCOUR, J.A., MARTENS, J. Dynamic Light Scattering (DLS) as a tool to detect CO<sub>2</sub>-Hydrophobin structures and study the primary *gushing* potential of beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 69, p. 144-149, 2011.

DECKERS, S.M.; VENKEN, T.; KHALES, M.; GEBRUERS, K.; BAGGERMAN, G.; LORGUILLOUX, Y.; SHOKRIBOUSJEIN, Z.; ILBERG, V.; SCHÖNBERGER, C.; TITZE, J.; VERACHTERT, H.; MICHIELS, C.; NEVEN, H.; DELCOUR, J.; MARTENS, J.; DERDELINCKX, G.; MAEYER, M.D. Combined Modeling and Biophysical Characterisation of CO<sub>2</sub> Interaction with Class II Hydrophobins: New Insight into the Mechanism Underpinning Primary *Gushing*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 70, p. 249-256, 2012.

De GAETANO, G.; COSTANZO, S.; DI CASTELNUOVO, A.; BADIMON, L.; BEJKO, D.; ALKERWI, A'A.; CHIVA-BLANCH, G.; ESTRUCH, R.; LA VECCHIA, C.; PANICO, S.; POUNIS, G.; SOFI, F.; STRANGES, S.; TREVISAN, M.; URSINI, F.; CERLETTI, C.; DONATI, M.B.; IACOVIELLO, L. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, p. 443–467, 2016.

INÑÓN, F. A.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Combination of mid- and near-infrared spectroscopy for the determination of the quality properties of beers. **Analytica Chimica Acta**, v. 571, p. 167-174, 2006.

LACHENMEIER, D. W. Rapid quality control of spirit drinks and beer using multivariate data analysis of Fourier transform infrared spectra. **Food Chemistry**, v. 101, p. 825-832, 2007.

SINDCERV-Sindicato Nacional da Industria da cerveja: Cerveja e Saúde. Disponível em: < <http://www.sindicerv.com.br/cerveja-saude.php> >. Acesso em: 20 jan. 2017.

## **CAPÍTULO 2 – Caracterização Espectroscópica do processo de Brassagem utilizado na cerveja**

### **2.1- Fundamentação teórica**

#### **2.1.1- Breve histórico da cerveja**

A época exata do surgimento da cerveja ainda é desconhecida, mas papiros indicam que tenha surgido em aproximadamente 6000 a.C. na Mesopotâmia. A bebida é vinculada a produção de pão, pois ambos eram feitos dos mesmos ingredientes. Acredita-se ainda que a cerveja tenha surgido de uma má fabricação do pão, sendo conhecida como “pão líquido” (COUTINHO et al., 2012; De KEUKELEIRE et al., 1992). Nestes lugares a cevada crescia de forma selvagem, o que explica o grande consumo deste alimento, e era muito popular onde o clima não era propício para cultivo de frutas, como o cultivo de uvas que gerou o consumo dos vinhos. Há registros de várias populações que fabricavam a cerveja, como os povos da Suméria, Babilônia e Egito, sendo a difusão da bebida iniciada pelos egípcios que a utilizava como moeda de troca (BANFORTH, 2004).

Devido ao problema da ausência de saneamento básico e condições de higiene, a água consumida pela população nesta época frequentemente era contaminada, causando doenças. A cerveja foi a principal bebida durante o período medieval, que por ser fermentada era microbiologicamente mais segura do que as demais bebidas (BANFORTH, 2004). Por causa do alto consumo da bebida, na Babilônia (cerca de 1770 a.C.) criou-se o código *Hamurabi* que, entre outras medidas, estabelecia pena de morte aqueles que fabricassem cerveja ruim, sendo este o código de lei mais antigo para cerveja (COUTINHO et al., 2012).

Os monges foram os primeiros a pesquisar e tentar entender os processos envolvidos na cerveja, pois faziam parte da minoria que sabia ler e escrever. Na Europa foram os monges que dominaram a arte da cervejaria e da fabricação de cervejas cada vez mais fortes em sabor e teor alcoólico. E se deve aos monges da Alemanha a utilização do lúpulo na fabricação da cerveja (De KEUKELEIRE et al., 1992). Foi na Alemanha também que se instituiu a primeira Lei de pureza (“Reinheitsgebot”) e que ainda está em vigor. Ela foi criada pelo Duque Guilherme IV da Baviera em 1516, e estabelece que a cerveja seja fabricada apenas com água, malte (cevada malteada), lúpulo e leveduras (COUTINHO et al., 2012).

Foi com a Revolução Industrial que o modo de produção e distribuição da cerveja sofreu mudanças decisivas, com maquinários e produções cada vez maiores, estabelecendo fabricas por toda Europa. Após esta época a cerveja foi aos poucos difundida por todo o mundo. Na América do Sul, séculos antes da chegada dos espanhóis, os incas já bebiam cerveja feitas com grãos de milho. Mas a cerveja só chegou ao Brasil em 1808, sendo trazida pela família real portuguesa quando mudaram para o então Brasil colônia (COUTINHO et al., 2012).

Com a colonização as cervejas no Brasil eram somente as importadas, e por isso seu consumo era destinado aos que tinham melhor aquisição financeira. A primeira cerveja no Brasil foi produzida pela cervejaria Bohemia em 1853 na cidade de Petrópolis-RJ, de origem alemã. As primeiras indústrias inteiramente brasileiras só surgiram depois da proclamação da república, em 1889 (LAPERRE, 2015). Depois que começou a produção da cerveja no Brasil, este só cresceu, se tornando o terceiro país que mais produz cerveja. As maiores produtoras são Ambev (Inbev), Petrópolis, Heineken e Brasil Kirin, sendo produzido principalmente cervejas tipo Pilsen.

Em 2008 começou uma revolução no mercado da cerveja no Brasil, com o surgimento das microcervejarias com suas cervejas artesanais. Estas pequenas empresas apostaram na fabricação de diferentes tipos de cerveja, sendo a maioria diferentes das tradicionais brasileiras, ou seja, diferente das Pilsen. Desde então este seguimento só vem crescendo, hoje são mais de 372 microcervejarias com quase 1000 rótulos registrados (FERREIRA, 2016; PIATO & RÉVILLION, 2013).

### **2.1.2- Benefícios da cerveja**

O consumo moderado da cerveja traz tantos benefícios quanto o vinho. Entende-se por consumo moderado a ingestão de 250 mL de cerveja por dia para mulheres e 500 mL para homens (SALLES, 2015). Em uma dieta de 2000 kcal uma cerveja participa de 7% da energia requerida.

A cerveja é rica em diversidade de compostos, entre os quais antioxidantes e vitaminas provenientes dos cereais malteados. O consumo moderado pode proteger o homem de doenças cardiovasculares como ataques cardíacos e algumas formas de trombose. A explicação reside no fato de que o consumo moderado de álcool aumenta os níveis do chamado “colesterol bom” (HDL- High density Lipoproteins) (De GAETANO et al., 2016; FAGRELL et al., 1999).

As vitaminas do complexo B também estão presentes na cerveja, sendo a tiamina, niacina, riboflavina e piridoxina, os quais são responsáveis pela redução da homocisteína, proteína que pode causar enfarte (CERVESIA, 2013). Além disso, a niacina (vitamina B3) auxilia a queima de gordura e carboidratos; a riboflavina (vitamina B2) contribui para o rejuvenescimento da pele, crescimento dos cabelos, das unhas e tem efeito cicatrizante; a vitamina B5 (ácido panthoténico) ajuda na sintetização de lipídios e os açúcares dos alimentos; e a vitamina B12 produz serotonina e dopamina no organismo que provocam sensação de bem-estar (De GAETANO et al., 2016).

O ferro, que é característico das cervejas escuras, é essencial para ajudar a distribuição de oxigênio através do sangue e ajuda a combater a anemia. O etanol, em dose moderada, tem propriedades anticoagulantes assim como o ácido acetil-salicílico e contribui para evitar o acúmulo de gordura nas paredes arteriais (De GAETANO et al., 2016; SINDCERV). A cerveja é rica em silício natural, elemento que permite melhorar a densidade mineral dos ossos e previne a osteoporose (De GAETANO et al., 2016).

### **2.1.3- Matérias-primas e os processos de fabricação**

As principais matérias-primas da cerveja são: água, malte, lúpulo, levedura e adjuntos. Cada componente tem características específicas e são fundamentais no processo de fabricação da cerveja.

#### **2.1.3.1- Água**

Água é a matéria-prima mais importante para a fabricação de cerveja, pois constitui 92 a 95% do peso da cerveja, sendo que seus constituintes refletem na qualidade e característica da cerveja final, por isso a escolha do local para instalar uma cervejaria se torna um fator decisivo (VENTURINI FILHO, 2010).

A água possui diversos tipos de sais dissolvidos e matéria orgânica variando conforme o local. Dentre os principais sais da água estão: cálcio, magnésio, sulfato e cloreto. O cálcio é um dos componentes mais importante, pois protege a enzima amilase da desnaturação térmica precoce, ajuda no controle do pH, melhora o rendimento e a floculação das leveduras; a concentração está entre 20-150 mgL<sup>-1</sup> (BRIGGS et al., 2004). O magnésio auxilia no processo de fermentação, pois influencia o metabolismo das leveduras as quais em altas concentrações são indesejáveis por modificarem o sabor da cerveja, a concentração máxima aceitável deste composto é de 30 mgL<sup>-1</sup>. O sulfato

também influência no processo de fermentação, as leveduras metabolizam o sulfato produzindo sulfureto de hidrogênio, dióxido de enxofre entre outras substâncias que contribuem para o aroma da cerveja, a concentração do sulfato varia de 10-250 mgL<sup>-1</sup>. O cloreto tem função de limitar a floculação das leveduras para melhorar a clarificação e estabilidade da cerveja sendo aceitável a concentração máxima de 150 mgL<sup>-1</sup>. Cervejas amargas estão associadas com águas que contém elevados teores de sulfato de cálcio. Quanto menor o teor de sulfato de cálcio e maior de carbonato de cálcio resulta em água apropriada para a fabricação de cervejas mais escuras e adocicadas (VENTURINI FILHO, 2010).

### 2.1.3.2- Malte

A palavra Malte refere-se a cevada malteada, mas existem outros grãos que podem ser malteados, porém é denominado que o malte que não for obtido da cevada leve o nome do cereal, por exemplo malte de trigo, quando o cereal malteado for o trigo. A cevada (*Hordeum vulgare*) é uma planta gramínea cerealífera que compõe o ranque dos cinco cereais mais produzidos no mundo (Figura 2.1) sendo sua cultura tipicamente de inverno (REINOLD, 1997).



**Figura 2.1-** Imagem da cevada em campo, e dos grãos extraídos.

Para a produção de cerveja, o grão da cevada deve passar pelo processo de malteação para melhorar as suas características. O grão da cevada tem um alto teor de amido e teor moderado de proteínas, além disso a casca serve de meio filtrante, e importantes enzimas estão presentes no grão, por isso é ideal para ser utilizada na produção de cerveja. A cevada ideal para maltear é aquela que possui alto teor germinativo e um baixo teor de proteínas para que seja mais solúvel (CARVALHO, 2005). O grão é constituído de três partes principais: o endosperma, que é basicamente a

reserva de amido e alguns carboidratos como a sacarose; a casca que protege o grão contra as influências externas danosas; e o embrião que sobre condições adequadas germina, formando folículo e raiz, e inicia o processo de transformação do endosperma ativando as enzimas presentes (REINOLD, 1997; VENTURINI, 2005).

O malte é um ingrediente muito importante da cerveja, pois agregam a bebida o sabor característico, cor e aroma, por isso entres os grãos utilizados na fabricação deve-se utilizar prioritariamente o malte.

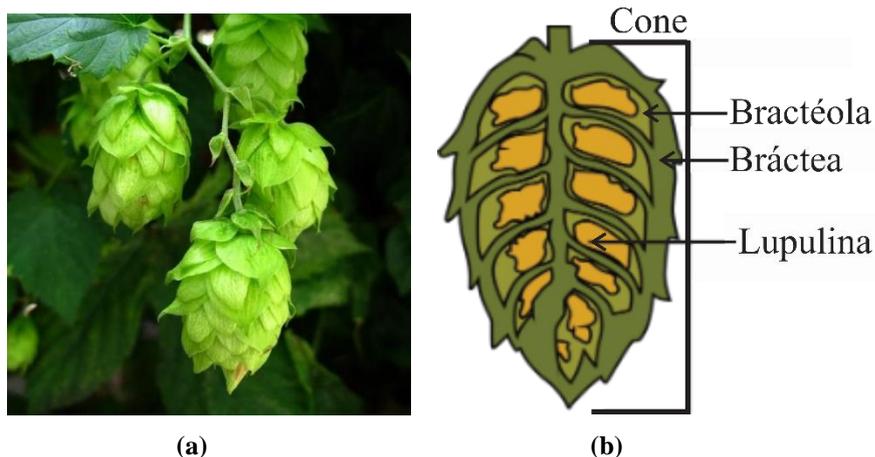
### **2.1.3.3- Adjuntos**

Os adjuntos podem ser definidos como qualquer ingrediente que não esteja na lei de pureza Alemã da cerveja (“Reinheitsgebot”). Os mais comuns são os cereais malteados ou não com propriedades que benéficamente complementa ou suplementa o processo, utilizados juntos com o malte, fornecendo mais uma fonte de açúcares fermentáveis. Os cereais comuns são milho, aveia, arroz e trigo (DRAGONE, 2002). Ainda temos a utilização de xaropes e açúcares como adjuntos, que são utilizados para atenuar características específicas da cerveja, por exemplo o caramelo usado em cervejas escuras para proporcionar cor, sabor e aroma característicos a esse tipo de cerveja, como a do tipo Malzbier (VARNAM & SUTHERLAND, 1997).

Os adjuntos começaram a ser inseridos, principalmente os cereais, como forma de diminuir o custo de produção da cerveja, porém hoje são utilizados como característica de alguns tipos de cerveja (BOULTON & QUAIN, 2001). Por exemplo, temos a utilização do trigo para a produção da cerveja tipo Weizenbier e Berliner Weisse (EATON, 2006).

### **2.1.3.4- Lúpulo**

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta trepadeira de difícil cultivo e típica de regiões frias (BOULTON & QUAIN, 2001). Esta planta produz flores macho e fêmea em partes diferentes de sua estrutura, a parte utilizada na cerveja são as flores fêmeas (Figura 2.2). Essas flores fêmeas são agrupadas em cachos, possuindo uma vertebra com várias dobras, sobre as quais se fixam pares de brácteas e bractéolas, que formam uma espécie de bolsa que armazena grânulos de lupulina (BOULTON & QUAIN, 2001).



**Figura 2.2-** (a) Flores fêmeas do lúpulo. (b) estrutura de uma flor fêmea.

A lupulina é o componente principal das flores fêmeas, pois apresenta grande quantidade de resinas amargas e óleos essenciais, os quais conferem o sabor amargo e o aroma que caracterizam a cerveja (VENTURINI FILHO, 2010). As resinas amargas contêm  $\alpha$ - e  $\beta$ - ácidos, sendo os  $\alpha$ -ácidos os mais importantes para o sabor amargo da cerveja, pois é o componente que quase não sofre perda durante o processo de fabricação. Os óleos essenciais dependem muito da variedade de lúpulo utilizado, os quais dão a cerveja características específicas.

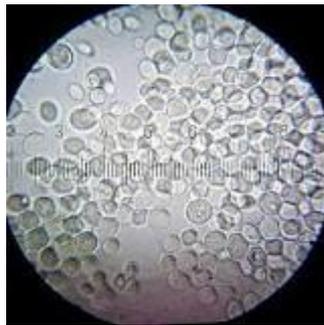
O lúpulo é conhecido como o “tempero” da cerveja e é ele que diferencia uma cerveja de outra, sendo um dos segredos de cada mestre cervejeiro para diferenciar seu produto dos demais. O lúpulo também auxilia no equilíbrio da espuma, ajuda na remoção de algumas proteínas indesejáveis, e devido as suas propriedades bactericidas são um conservante natural.

### 2.1.3.5- Levedura

As leveduras são microrganismos monocelulares pertencentes ao reino fungi, e são o fermento para fabricação de cerveja. O principal produto da fermentação feita pelas leveduras é o etanol e o dióxido de carbono. No entanto, inúmeros outros compostos são produzidos em menores proporções, e estes, são de grande importância no sabor da cerveja (RUSSELL, 2006).

Nas cervejarias são utilizadas as leveduras do gênero *Saccharomyces* (Figura 2.3), por sua capacidade de fermentar um grande número de açúcares diferentes, tais como maltose, maltotriose, sacarose, glicose, frutose, galactose, rafinose, entre outros. Além disso, as cepas de leveduras são capazes de utilizar uma ampla variedade de nutrientes

para suportar seu crescimento e gerar energia. Uma propriedade importante deste gênero é a captação seletiva, sendo a assimilação de carboidratos e compostos nitrogenados processos altamente regulados. Devido à variedade de nutrientes, as leveduras tendem a usar primeiro aqueles que são mais facilmente assimilados, por exemplo no mosto com glicose e maltose, elas utilizariam primeiro a glicose (monossacarídeo) e depois metabolizariam a maltose (dissacarídeo). Além disso, pode ocorrer que um composto iniba a utilização do outro (BOULTON & QUAIN, 2001).

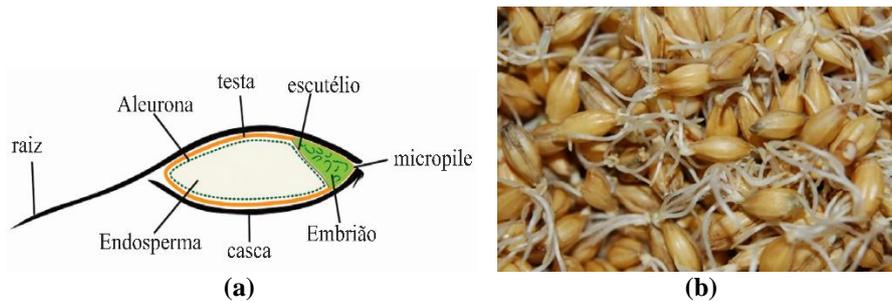


**Figura 2.3-** Imagem microscópica de levedura do gênero *Saccharomyces*.

O desempenho das leveduras cervejeiras na fermentação é influenciado por vários fatores, como: a escolha da cepa de levedura, tolerância ao estresse, concentração celular do inoculo, concentração e variedade de açúcares e compostos nitrogenados, além de temperatura, pH, oxigênio dissolvida e densidade do mosto (CARVALHO et al., 2006).

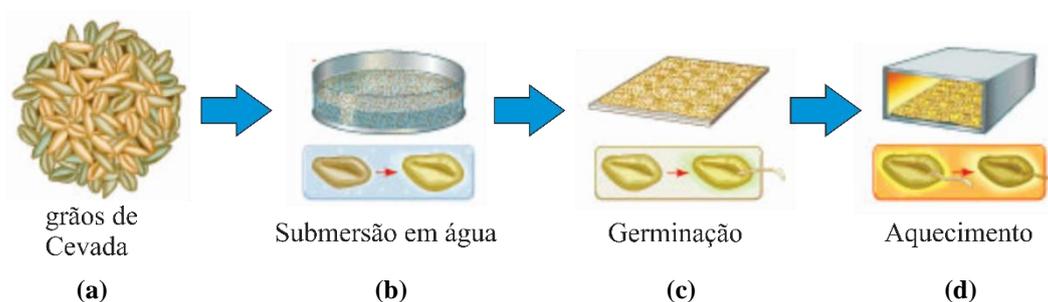
#### **2.1.3.6- Processos da fabricação de cerveja**

O processo tradicional de produção de cerveja pode ser dividido em nove operações essenciais: malteação, moagem do malte; brassagem; filtração do mosto; fervura do mosto; tratamento do mosto; fermentação; maturação e clarificação. A malteação é o processo de germinação controlada do grão, transformando-o em um grão muito mais friável, com maiores níveis de enzimas e com propriedades físico-químicas alteradas (BARTH, 2013; EATON, 2006). A Figura 2.4 mostra a estrutura de um grão de cevada, sendo que o embrião se encontra na extremidade do grão que é separado do endosperma por membrana chamada célula epitelial escutelar (ou escutélulo). O endosperma contém grânulos de amido, tendo cada um deles um revestimento proteico (BARTH, 2013).



**Figura 2.4-** (a) estrutura do grão de cevada (adaptado de BARTH (2013)); (b) grão de cevada germinado na etapa de malteação.

A primeira parte da malteação imita o que ocorreria na natureza se o grão fosse germinado em campo. Assim, primeiramente o grão é mergulhado em água fria, sendo drenado as vezes para não o asfixiar, por geralmente dois dias (Figura 2.5 (b)). Quando estão completamente úmidos, são dispostos em uma caixa e então os grãos começam a crescer, produzindo raízes e brotos, nesta etapa o grão é mantido úmido e frio, passando ar molhado (Figura 2.5(c)). O embrião então, produz e libera um hormônio vegetal chamado de giberelina, que ativa a camada de aleurona para produzir várias enzimas. Estas enzimas, juntamente com as já presentes no grão, começam a quebrar as reservas de alimento do grão, ou seja, o amido e as proteínas que estão no endosperma. Quando isso ocorre, a germinação é imediatamente interrompida por aquecimento antes que o broto emerja do grão, esta etapa é conhecida como secagem (Figura 2.5(d)). Na secagem utiliza-se temperaturas em torno de 80 a 100°C, assim o malte desenvolve também cor e sabor. Após a etapa de secagem, as raízes são removidas e o malte armazenado para o uso (BARTH, 2013; EATON, 2006; PALMER, 2006).



**Figura 2.5-** Etapas do processo de malteação dos grãos de cevada (Adaptado de GÓES (2014)).

Após a malteação os grãos devem passar pela etapa de moagem. Nesta etapa é utilizado um moedor para quebrar a casca e liberar o endosperma para obter maior contato

com a água durante a brassagem. O objetivo deste processo é a redução do grão de malte de modo uniforme, para obter: (1) rompimento da casca no sentido longitudinal, expondo, dessa forma, o endosperma; (2) a desintegração total do endosperma, promovendo uma melhor atuação enzimática e (3) a produção mínima de farinha com granulometria muito fina, evitando a formação de substância que produzam uma quantidade excessiva de pasta dentro da solução (DRAGONE, 2002). Além disso, na maioria dos casos, o cervejeiro evita a pulverização da casca, pois esta parte ajudará na filtragem, e porque o pó da casca estraga o sabor da cerveja (BARTH, 2013).

A brassagem é a etapa que mistura o malte moído, juntamente com água em temperatura controlada, para que ocorra a extração dos açúcares presentes. O objetivo neste processo é solubilizar as substâncias do malte diretamente solúveis em água e as demais com auxílios das enzimas, promovendo a gomificação e posterior hidrólise do amido a açúcares. Nesta etapa deve-se considerar que todo processo enzimático depende da temperatura, do tempo, do grau de acidez e concentração do meio, da qualidade do malte e constituição do produto da moagem. O produto final desta etapa é conhecido como mosto, e contém de 70-80% de carboidratos fermentáveis, incluindo glicose, maltose e maltotriose (VENTURINI FILHO, 2010). Esta etapa será melhor discutida na próxima seção.

Após a conversão do amido em açúcares e outros produtos, deve-se filtrar o mosto para separar as partículas maiores, e a casca dos grãos. A filtragem do mosto é realizada em um recipiente denominado tina de filtração, constituído em aço inoxidável contendo agitador, disco filtrante, bomba centrífuga e isolante térmico. A casca do malte serve como camada filtrante. Água quente (aproximadamente a 75°C) é pulverizada para lavar esta camada filtrante retirando assim todo açúcar que possa estar nela, visando aumentar a extração de açúcar e conseqüentemente, elevar o rendimento do processo (DRAGONE, 2002).

Ao mosto filtrado acrescenta-se o lúpulo e submete a mistura à fervura. Esta etapa visa: a completa inativação de enzimas; esterilização do mosto matando microrganismos indesejáveis; coagulação do excesso de proteínas e taninos que formam partículas sólidas (*trub*) e que são removidas posteriormente; extração de compostos amargos e aromáticos do lúpulo formando as principais substâncias constituintes do aroma e sabor; e evaporação de água excedente elevando a concentração dos açúcares; e remoção de componentes voláteis aromáticos indesejáveis ao produto final (EATON, 2006; BARTH, 2013).

Após a sua fervura, o mosto deve passar por etapas de retirada do precipitado, resfriamento e posterior aeração, esta etapa é o tratamento do mosto. Para a retirada do precipitado utiliza-se da rotação forçada do meio, precipitando-se os complexos de *trub*, os quais sedimentam no fundo do tanque, sendo separados do mosto límpido. Depois da retirada do *trub*, o mosto é resfriado em trocador de calor de placas, até a temperatura de fermentação desejada (DRAGONE, 2002). Na saída do trocador de calor ocorre a aeração, sendo injetado oxigênio visando obter uma concentração de oxigênio dissolvido de 20 ppm, no tanque de fermentação (DRAGONE, 2002).

Posteriormente, começa o processo de fermentação que consiste no ponto central para produção de qualquer bebida alcoólica, pois é a etapa que ocorre a conversão de açúcares em álcoois (principalmente etanol, no caso da cerveja) e gás carbônico pelas leveduras, sob condições anaeróbicas (PICKERELL et al., 1991). As fermentações são iniciadas utilizando culturas de leveduras como fermento, sendo fornecido geralmente 5 a 20 milhões de células de levedura por mililitro de mosto (EATON, 2006). Na fase inicial, que dura algumas horas, as leveduras se ajustam ao ambiente tornando suas membranas mais fluidas para que aja fácil ingestão do alimento, principalmente açúcares. Nesta fase elas parecem adormecidas com pouca atividade, essa é a fase de latência. Depois, começa a fase de multiplicação das leveduras, quando as células brotam para produzir novas células usando a reserva de carbono de glicogênio, sendo o oxigênio adicionado anteriormente fundamental nesta etapa (EATON, 2006). Conforme o oxigênio for consumido, as condições anaeróbicas vão prevalecendo, e assim as leveduras começam a transportar os açúcares para as células formando piruvato, sendo todos os açúcares fermentáveis (maltose, maltotriose, glicose, frutose etc.) utilizados de forma ordenada. O piruvato é metabolizado em etanol e dióxido de carbono, que são transportados para fora das células. O excesso de dióxido de carbono pode ser descarregado para fora do fermentador ou recolhido para ser utilizado no envasamento, normalmente para este processo o fermentador é vedado com uma válvula unidimensional que permite que o gás escape, mas não permite que o ar entre. É ideal que um certo nível de CO<sub>2</sub> permaneça na cerveja para lhe dar efervescência. Por fim, a medida que os açúcares se esgotam, as leveduras começam a flocular, indicando que o processo de fermentação está encerrando. É importante separar as leveduras por floculação, para obter uma cerveja mais limpa. A utilização dos açúcares pelas leveduras é a principal reação da fermentação, porém, não é a única, os aminoácidos que também estão presentes no mosto são consumidos pelas leveduras como nutrientes (HUGHES & BAXTER, 2001; LEI et

al., 2013). Além disso, nesta etapa são produzidos centenas de compostos em menores quantidades, mas que contribuem para o sabor da cerveja, e variam dependendo da tensão das leveduras e da temperatura de fermentação. Sendo produzido, também, componentes indesejáveis, que influenciam de forma negativa nas propriedades organolépticas da cerveja, um dos mais conhecido é o diacetil que também é produzido através do piruvato. Este composto, assim como outros, pode ser minimizado no processo de fermentação, quando se dá tempo para as leveduras o dividir em acetoin e butanodiol (EATON, 2006). Os processos que ocorrem durante toda a fermentação são exotérmicos, e liberam uma grande quantidade de calor, desta forma, tem que ter cuidado para sempre controlar a temperatura do ambiente do fermentador, o qual deve-se manter resfriado. Ao fim da fermentação, a cerveja está quase pronta, e é chamada de cerveja verde (green beer).

Após a fermentação, ocorre o processo de maturação, também chamada de fermentação secundária, que consiste no armazenamento da cerveja fermentada a baixa temperatura (0°C) durante um determinado período de tempo, que pode ser dias ou semanas dependendo do tipo de cerveja desejado. Durante este processo ocorre alterações de grande importância para a qualidade da cerveja, como: (1) a carbonatação da cerveja provocada pelo gás carbônico produzido; (2) o repouso a baixa temperatura que provoca a precipitação dos resíduos de leveduras o qual ainda permanecem na cerveja, e de polipeptídios, polifenóis e outras substâncias insolúveis indesejáveis a cerveja; (3) maturação do aroma e sabor (GODFREYSEN & OTTESEN, 1982).

A última etapa do processo de fabricação da cerveja é a clarificação. Após a maturação, a cerveja contém leveduras, partículas coloidais, e outras substâncias insolúveis, desta forma para se obter um produto brilhante e límpido é necessária uma etapa de clarificação, previa ao engarrafamento. Esta etapa permite remover todo material insolúvel, e para isso são utilizados frequentemente quatro técnicas, que podem ser empregadas separadamente ou em combinação: (1) sedimentação por gravidade; (2) uso de agentes clarificantes; (3) centrifugação; (4) filtração (BANFORTH, 2003).

Os processos descritos acima é uma visão geral da fabricação de cerveja, sendo utilizado para fabricação de cervejas tradicionais, mas podem ser modificados de acordo com o tipo de cerveja desejado. Por exemplo, quando se utiliza cereais como adjuntos, como nas cervejas de trigo que tem o processo de brassagem adequando à temperatura tanto da cevada quanto do trigo. Outro exemplo é a não utilização da etapa de clarificação na produção das cervejas de trigo, ou seja, o excesso de leveduras está presente no produto final.

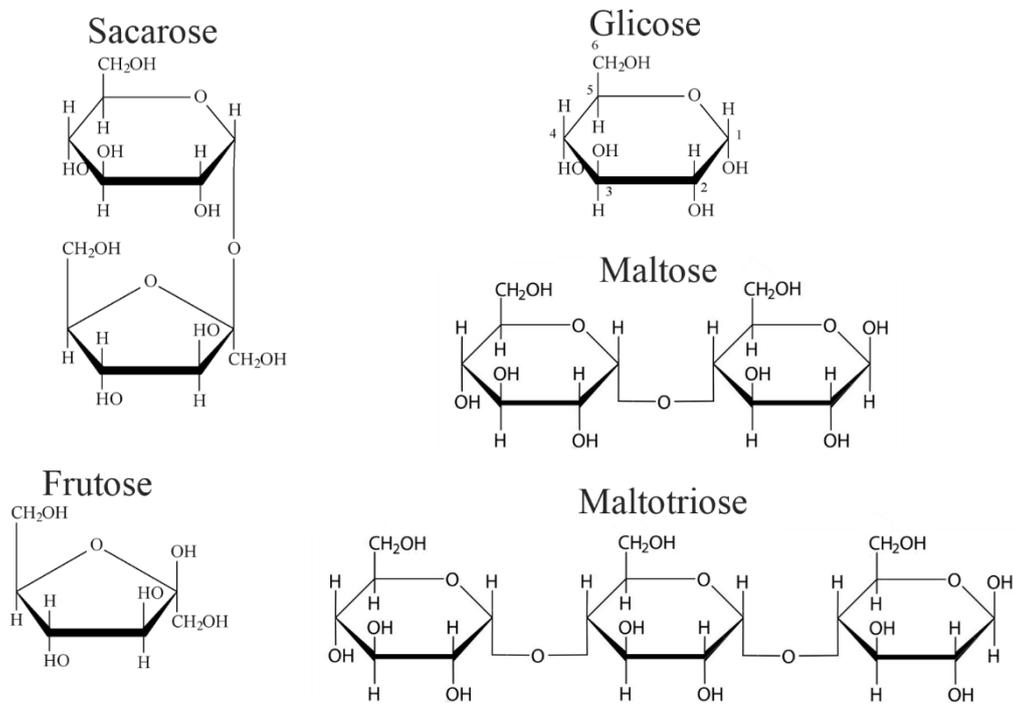
#### 2.1.4- Brassagem

A brassagem é a etapa mais importante para a fabricação da cerveja, pois é a etapa de hidrólise do amido, que determina a quantidade de carboidratos fermentáveis e assim indica o grau de álcool do produto final (BRANDAM et al., 2003; DURAND et al., 2009). Seu principal objetivo é transformar o amido do malte em açúcares fermentáveis pela ativação das enzimas do próprio malte de forma mais eficiente possível (BRANDAM et al., 2003). A brassagem é conhecida também como mosturação, por estar ligada a preparação do mosto. O processo consiste na mistura do malte moído juntamente com água em temperatura controlada sob agitação.

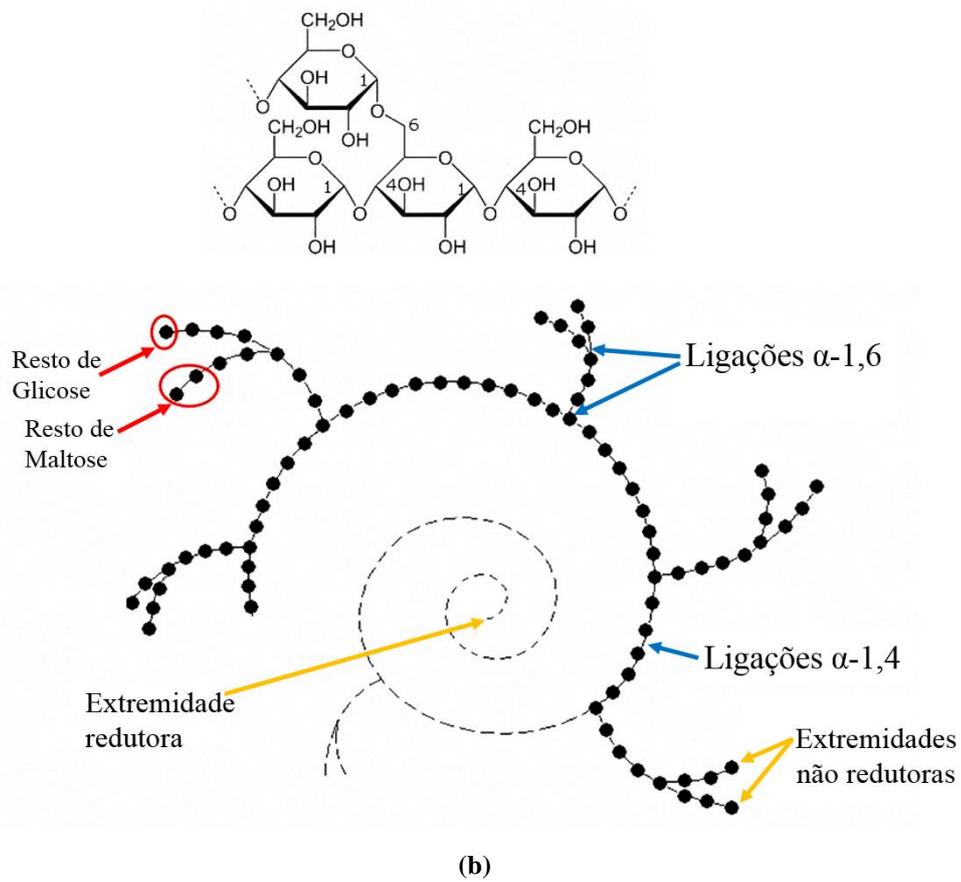
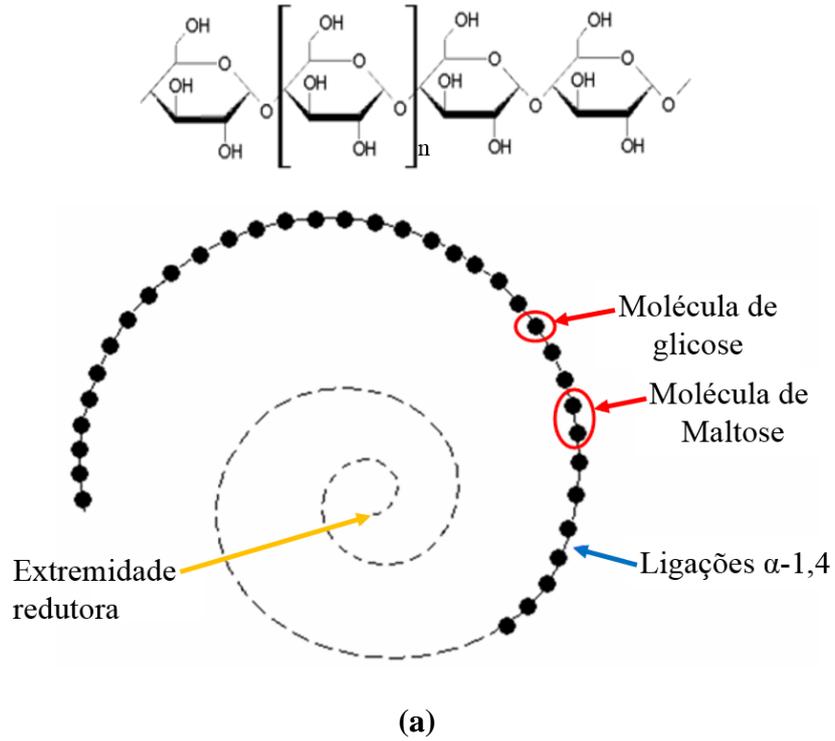
O malte é o principal ingrediente da brassagem, sendo composto principalmente por carboidratos, proteínas, matérias inorgânicas e lipídeos. A Tabela 2.1 mostra a porcentagem destes compostos no malte, sendo os carboidratos os mais abundantes (70-85%). Os carboidratos totais representam o amido, a celulose, a hemicelulose, e os açúcares. A celulose é composta por cadeias longas que são insolúveis em água. A hemicelulose é o principal constituinte das paredes das células, e são cadeias complexas e ramificadas, podendo possuir diferentes ramificações, como ácidos carboxílicos. Os açúcares representam somente 2,0% do grão, e são frequentemente glicose, frutose, sacarose, maltose e maltotriose (Figura 2.6). O amido é o principal componente e representa mais de 50% do grão de cevada, sendo composto de cadeias de amilopectina e amilose. A amilose é uma estrutura linear de mais de 1000 moléculas de glicose formada por ligações  $\alpha$ -1,4 solúvel em água, e corresponde a aproximadamente 20-25% do amido (Figura 2.7(a)) (BRIGGS et al., 2004). A amilopectina corresponde aos 75-80% do amido, e é constituída também por inúmeras moléculas de glicose que são ligadas por ligações  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6, sendo que está lhe confere uma estrutura ramificada mais complexa que a amilose, e portanto, menos solúvel em água (Figura 2.7(b)).

**Tabela 2.1-** Porcentagem dos compostos presentes no malte

Composto	%
Carboidratos totais	70,0 – 85,0
Proteínas	10,5 – 11,5
Matéria inorgânica	2,0 – 4,0
Lipídeos	1,5 – 2,0
Outras substâncias	1,0 – 2,0



**Figura 2.6-** Estruturas moleculares dos principais açúcares encontrados no grão da cevada.



**Figura 2.7-** Estruturas moleculares da amilose (a) e amilopectina (b) com respectivas estruturas de glicose.

Devido ao alto nível de amido no malte, e a vantagem de poder se transformar facilmente em açúcares, a etapa de brassagem se prevalece disso. A conversão ocorre pela ativação por temperatura de enzimas específicas que pertencem ao próprio malte. Existem várias enzimas que atuam neste processo, porém, as principais são hemicelulase,  $\beta$ -glucanase, protease, dextrinase e amilase, sendo que cada uma atua em temperaturas distintas e são dependentes do pH da solução. A Tabela 2.2 mostra a temperatura e pH ótimos para cada enzima. Normalmente, o pH para brassagem está entre 5,2 e 5,8, para que ocorra melhor a atuação de todas as enzimas. Os pHs fora desta faixa podem não ativar as principais enzimas, e ainda extrair compostos indesejáveis principalmente da casca do grão (BARTH, 2013).

**Tabela 2.2-** Principais enzimas atuantes na brassagem, e as faixas de temperatura e pH o qual estas têm atuação ótima.

Enzima	Temperatura ótima (°C)	pH ótimo
Hemicelulase	40 – 45	4,5 - 4,7
Protease	40 – 60	5,0 - 5,2
Dextrinase	55 – 60	5,1
$\beta$ -amilase	60 – 65	5,4 - 5,6
$\alpha$ -amilase	70 – 75	5,6 - 5,8

A brassagem é dividida em três etapas para que ocorra uma atuação eficiente das enzimas, chamadas: gelatinização, sacarificação e “mash out”. Gelatinização é a primeira etapa, e geralmente ocorre em temperaturas baixas, entre 45-60°C, e consiste em solubilizar principalmente o amido (KROTTENTHALER et al., 2009). Se a gelatinização começa em torno de 45°C a enzima hemilcelulase é ativada, e atua na quebra da hemicelulose transformando-a em dextrina, que é composta por várias moléculas de glicose e é um açúcar não fermentável, pois a maioria das leveduras *Saccharomyces* não metabolizam este açúcar. Nas temperaturas de 45-50°C são ativadas as enzimas  $\beta$ -glucanase que atuam diretamente na quebra dos  $\beta$ -glucanos, um tipo de polissacarídeo não amiláceo presente no malte e que se solubiliza facilmente (DURAND et al., 2009). A protease age em temperaturas entre 40-60°C, que atua sobre as proteínas de alto peso molecular, como as da camada que envolve o amido, transformando-as em moléculas menores de médio e baixo peso molecular, como por exemplo peptídeos e aminoácidos (tirosina, triptofano, fenilalanina, prolina, lisina, entre outros), sendo esta etapa importante para gerar nutrientes que serão consumidos pelas leveduras no ciclo de

fermentação, e o que não for consumido vai para o corpo da cerveja. Os subprodutos gerados pela ação da protease são geralmente agrupados e chamados de compostos nitrogenados (FAN-free amino nitrogen).

A etapa de sacarificação é a transformação efetiva do amido em açúcares fermentáveis, aqueles que serão utilizados pelas leveduras. Esta etapa é realizada em temperaturas entre 60-70°C, e ocorre a ativação da enzima amilase. Esta enzima é dividida em dois tipos:  $\beta$ - e  $\alpha$ -amilase. A  $\beta$ -amilase atua nas extremidades da amilose e amilopectina quebrando as ligações  $\alpha$ -1,4, mas principalmente na penúltima ligação das extremidades não redutoras da amilopectina, assim formando principalmente maltose e maltotriose, e não quebra as ligações  $\alpha$ -1,6. A  $\alpha$ -amilase atua no meio das cadeias de amilopectina e amilose também nas ligações  $\alpha$ -1,4, formando dextrina, maltose e maltotriose; a sua atuação só atinge as cadeias até perto dos nós, ou seja, perto das ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina, assim a maior parte dos seus subprodutos são de açúcares maiores como a dextrina. A enzima dextrinase também faz parte do processo de sacarificação, pois quebra as ligações  $\alpha$ -1,6 da amilopectina transformando em maltose e maltotriose, porém sua temperatura ótima é baixa (55-60°C), por isso ela pode agir nesta etapa ou na anterior dependendo das temperaturas utilizadas (KROTTENTHALER et al., 2009; MacGREGOR et al., 1999).

Além das enzimas citadas, existe inúmeras outras que participam das transformações do malte, como a  $\alpha$ -glicosidase que atua na quebra do amido de forma similar a  $\alpha$ -amilase, porém sua temperatura ótima é inferior (40-45°C), sendo ativada na etapa de gelatinização se a brassagem for feita no limite de temperatura.

Para finalizar a brassagem utiliza-se o “mash out”, que é a utilização de certa temperatura para desnaturar as enzimas que ainda estão ativas no mosto, geralmente utiliza-se 78°C para esta finalidade (BANFORTH, 2003).

Vale ressaltar que alguns subprodutos gerados durante a brassagem são indesejáveis para a cerveja. Dentre eles estão os  $\beta$ -glucanos e arabinosilanos (pentosanos), que em concentrações elevadas causam problemas no processamento, como formação de neblina, e fraca filtrabilidade do mosto (DURAND et al., 2009). A dextrina, como açúcar não fermentável, deve também ser monitorada para não exceder em suas concentrações, pois participam diretamente nas características organolépticas da cerveja.

Existem vários métodos de se fazer a etapa de brassagem, os mais comuns são infusão, decocção e múltiplas rampas. Na infusão o malte não recebe fogo direto, os grãos são depositados em um recipiente e água quente é adicionada em etapas, com o intuito de

umentar a temperatura conforme o cronograma, para isso exige-se um malte de alta qualidade e bem germinado (malteado), e para se manter a temperatura de sacarificação por pelo menos uma hora, deve-se manter em um forno já pré-aquecido ou em uma caixa térmica (EATON, 2006; PALMER, 2006). Para o método de decocção uma parte do mosto é separado e aquecido até o ponto de ebulição, sendo devolvido ao recipiente principal e assim eleva-se a temperatura. Neste método utiliza-se várias rampas de temperatura, e pode-se utilizar a retirada de parte do mosto por uma ou mais vezes, gerando uma decocção simples, dupla ou tripla (EATON, 2006). A decocção é comumente utilizada se além do malte utiliza-se outros cereais como adjuntos.

O método de múltiplas rampas consiste em usar uma fonte de calor para aquecer o mosto em rampas de temperaturas diferentes, podendo ativar as enzimas de forma ordenada, seguindo as temperaturas ótimas por tempos determinados. Quando o único cereal utilizado para brassagem é o malte, ou seja, não se utiliza adjuntos, o método de múltiplas rampas é comumente utilizado (PALMER, 2006). Geralmente feito com apenas três rampas de temperatura. Para o início da gelatinização utiliza-se temperaturas em torno de 50°C por 30 min, logo após o mosto é aquecido até 65°C para a etapa de sacarificação, por aproximadamente 1 h, e para finalizar utiliza-se uma rampa de até 20 min à 78°C para inativação enzimática (BANFORTH, 2003; BRANDAM et al., 2003; JONES & BUDDE, 2005). A escolha do tipo de brassagem ou programa de tempo/temperatura a ser aplicado durante a atuação enzimática vai depender da composição e do tipo de cerveja desejado, e deve-se ter conhecimento do quanto de açúcares fermentáveis deseja-se ou do quanto de substâncias proteicas de alto peso molecular almeja-se para o “corpo” da cerveja e consistência da espuma.

Quando se está produzindo a brassagem é indispensável que se utilize método de monitoramento do processo. Para tanto os mais simples e utilizados principalmente por cervejeiros caseiros, são: o teste de iodo e a medida do °Brix. O teste do iodo é um teste de sacarificação, que analisa visualmente se o mosto ainda tem amido ou não, e consiste em retirar uma gota do mosto, geralmente ao final da etapa de sacarificação, e misturar com iodo, se a mistura permanecer com a cor natural do iodo significa que todo o amido foi transformado, se ocorrer alteração na cor, geralmente para uma cor escura, significa que existe amido ainda no mosto. O °Brix é medido por um refratômetro, sendo feita após o termino do processo de brassagem, este equipamento mede o índice de refração da solução em relação ao da água e relaciona com a quantidade de açúcares dados em °Brix. O °Brix foi criado por Adolf Ferdinand Wenceslaus Brix, que alterou a antiga escala

Balling recalculando para temperatura de 15,5 °C. Se o mosto tiver 16 °Brix significa que 16 g em 100 g de solução são açúcares. É importante medir este índice pois será utilizado para os cálculos na etapa de fermentação.

### 2.1.5- Classificação da cerveja

As cervejas podem ser classificadas de várias formas, sendo que os vários tipos de cervejas comerciais são decorrentes da maneira como são processadas as matérias-primas, da quantidade em que elas são utilizadas, a duração das etapas de fabricação e o processo tecnológico empregado. Segundo a legislação brasileira, art. 38 do decreto 6871 (PLANALTO, 2009), as cervejas são classificadas em cinco categorias:

#### 1. Quanto ao extrato primitivo:

- a) Cerveja leve: extrato primitivo maior ou igual a 5% em peso e menor que 10,5% em peso; podendo denominar-se cerveja **light** a cerveja leve que cumpra também, cumulativamente, os seguintes requisitos: (1) redução de 25% do conteúdo de nutrientes ou do valor energético com relação a uma cerveja similar do mesmo fabricante (mesma marca comercial), ou do valor médio do conteúdo de três cervejas similares conhecidas e que sejam produzidas na região; e (2) valor energético da cerveja pronta para o consumo deve ser no máximo de 35 kcal/100 mL;
- b) Cerveja ou cerveja comum: extrato primitivo maior ou igual a 10,5% em peso e menor que 12% em peso;
- c) Cerveja extra: extrato primitivo maior ou igual a 12% em peso e menor ou igual a 14% em peso;
- d) Cerveja forte: extrato primitivo maior que 14% em peso.

#### 2. Quanto à cor:

- a) Cerveja clara: cor correspondente a menos de 20 EBC (European Brewery Convention);
- b) Cerveja escura: cor correspondente a 20 EBC ou mais;
- c) Cerveja colorida: por ação de corantes naturais, apresenta coloração diferente das definidas no padrão EBC.

#### 3. Quanto ao teor alcoólico:

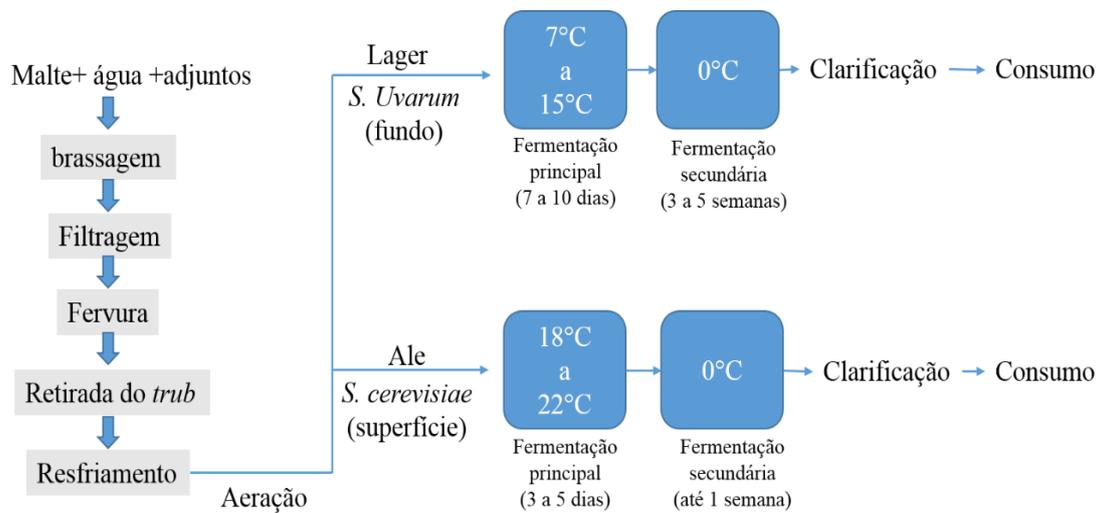
- a) Cerveja sem álcool: conteúdo em álcool menor ou igual a 0,5% em volume, não sendo obrigatória a declaração no rótulo;

- b) Cerveja com álcool: conteúdo em álcool superior a 0,5% em volume, devendo obrigatoriamente constar no rótulo o percentual de álcool em volume.
4. Quanto à proporção de malte de cevada:
- Cerveja de puro malte: possui 100% de malte de cevada em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;
  - Cerveja: possui proporção de malte de cevada maior ou igual a 55% em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares;
  - “Cerveja de ...”, seguida do nome do vegetal predominante: possui proporção de malte de cevada maior que 20% e menor que 55%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares.
5. Quanto à fermentação:
- de baixa fermentação;
  - de alta fermentação.

Mundialmente, predomina-se a classificação pelo tipo de fermentação, denominando *Lager* para as de baixa fermentação e *Ale* para alta fermentação (AQUARONE et al., 2001), e são descritas como:

- Lager:** este tipo de cerveja é fermentado pelas cepas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas leveduras são de baixa fermentação, pois tem sua atividade entre 7-15°C, as quais ao flocularem são coletadas na base do fermentador. Esta fabricação, por fermentação lenta, origina uma cerveja mais fraca, com teor alcoólico de 3 a 5%. É o tipo mais consumido no Brasil.
- Ale:** este tipo de cerveja é fermentado pelas cepas de *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*). Esta fermentação é caracterizada por seu rápido processamento, e originam geralmente uma cerveja clara, com sabor pronunciado de lúpulo, com teor alcoólico entre 4 a 8%. As leveduras utilizadas são de alta fermentação e fermentam entre 18 e 22°C. Além disso, este processo é diferenciado por apresentar um fermento que sobe ao topo do tanque em forma de espuma, por isso geralmente são denominadas “fermentação alta”.

A Figura 2.8 representa as diferenças em produção e fermentação das leveduras nos dois tipos de cerveja.



**Figura 2.8-** Processamento dos dois principais tipos de cervejas, tipo *Ale* e *Lager*.

As cervejas tipo *Ale* estão subdivididas principalmente em Stout, Bitter, Barley Wine, Pale, e India Pale, red entre outros. E as do tipo *Lager* são Bock, Ice, Light, Pilsen, entre outros. A Pilsen é a cerveja mais consumida no Brasil. A Tabela 2.3 mostra as diferenças entre os estilos de cerveja *Ale* e *Lager*. O extrato primitivo, é a quantidade de extrato no mosto após a filtragem, e o extrato aparente é o extrato após a etapa de fermentação o qual recebe esta denominação devido a influência que exerce no nível de álcool na fase final. O teor de amargor da cerveja é representado pela escala IBU, que é uma escala internacional a qual 10 a 15 a cerveja quase não aparenta amargor, e 30 é mediano, e acima de 50 o amargor é pronunciado. E a cor da cerveja é representada pela escala EBC, sendo consideradas claras até 28EBC, e escura acima deste valor.

**Tabela 2.3-** Estilos das cervejas tipo *Ale* e *Lager* e algumas de suas características (CHARLES, 2006).

Estilos	Extrato primitivo (°Brix)	Extrato aparente (°Brix)	Volume de álcool (%)	IBU <sup>a</sup>	Cor (EBC <sup>b</sup> )
<b><i>Ale</i></b>					
Pale Ale	1,044-1,056 (10,6 - 13,6)	1,008-1,016 (2,0 - 3,8)	4,5-5,5	20-40	10-28
India Pale Ale (IPA)	1,050 - 1,070 (12,0 - 16,4)	1,012 - 1,018 (3,0 - 4,4)	5,0-7,5	35-65	12-28
Bitter	1,033 - 1,038 (7,8 - 9,2)	1,006 - 1,012 (1,4 - 3,0)	3,0-3,7	20-35	16-24
Stout	1,080 - 1,100 (18,8 - 22,2)	1,020 - 1,030 (3,8 - 7,2)	7,0-12,0	50-80	40 +
Barley Wine	1,085 - 1,120 (20,8-27,0)	1,024 - 1,032 (5,8 - 7,8)	8,4-12,0	40-60	28-44
Red Ale	1,048 - 1,058 (11,6 - 13,8)	1,012 - 1,018 (3,0 - 4,4)	4,5-6,0	30-40	22-36
Weissbier	1,047 - 1,056 (11,4 - 13,6)	1,008 - 1,016 (2,0 - 3,8)	4,9-5,5	10-15	6-18
Belgian-Style Dubbel	1,050 - 1,070 (12,0 - 16,4)	1,012 - 1,016 (3,0 - 3,8)	6,0-7,5	18-25	28-36
Belgian-Style Tripel	1,060 - 1,096 (14,4 - 23,2)	1,008 - 1,020 (2,0 - 4,8)	7,0-10,0	20-25	7-14
<b><i>Lager</i></b>					
Bock	1,066 - 1,074 (16,0 - 17,4)	1,018 - 1,024 (4,4 - 5,8)	6,0-7,5	20-30	40-60
Ice	1,040 - 1,060 (9,6 - 14,4)	1,006 - 1,014 (1,4 - 3,4)	4,6-6,0	7-20	4-16
Light	1,024 - 1,040 (5,8 - 9,6)	1,002 - 1,008 (0,5 - 2,0)	3,5-4,4	5-10	3-8
Pilsen	1,044 - 1,056 (10,6 - 15,6)	1,014 - 1,020 (3,4 - 4,8)	4,0-5,0	30-45	6-14
Lager americana	1,040 - 1,046 (9,6 - 11,2)	1,006 - 1,010 (1,4 - 2,4)	3,8-5,0	5-14	4-8

<sup>a</sup>International Bitter Units- unidade de amargor;

<sup>b</sup>European Brewery Convention- unidade de cor utilizada no Brasil.

### 2.1.6- Técnicas de análise da cerveja

Os vários processos envolvidos na produção de cerveja são apenas parcialmente entendidos, apesar dos numerosos esforços de pesquisa e desenvolvimentos recentes na tecnologia. Dentre as técnicas mais utilizadas para análise das características da cerveja e do processo de produção encontra-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC- High performance liquid chromatography) e cromatografia gasosa (GC-gas chromatography). Existem vários estudos que utilizam estas técnicas para caracterizar os compostos presentes na cerveja, sendo analisados carboidratos (GOTSICK & BENSON,

1991; MARINELLI & WHITNEY, 1967) , álcoois (BUCKEE & MUNDY, 1993), aminoácidos (JIN et al., 1999), compostos fenólicos (de PACUAL-TERESA et al., 1998; MADIGAN et al., 1994; STEVENS et al, 1999), vitaminas (ANDRES-LACUEVA et al., 1998), ácidos carboxílicos (MIWA & YAMAMOTO, 1996), entre outros (CLARK et al., 1998; HILL & SMITH, 2000; PUSECKER et al., 1999; TING & GOLDSTEIN, 1996).

Estudos recentes revelam que as técnicas espectroscópicas é uma ferramenta importante na análise deste produto. MIGNANI et al. (2013) utilizou as técnicas de absorção no infravermelho próximo (NIR) e no ultravioleta-visível (UV-Vis) para caracterizar e diferenciar 86 cervejas belgas com diferentes composições, e descrevem que foi possível distinguir as classes de cervejas com esta metodologia. SIKORSKA et al. (2006) aplicou a espectroscopia de fluorescência para caracterizar as mudanças que ocorrem no processo de estocagem da cerveja com e sem influência de iluminação durante este processo, sendo observado a influência do composto riboflavina (vitamina B2) que decresce nas cervejas que foram expostas a luz. GHASEMI-VARNAMKHAISTI et al. (2012) caracterizou 83 cervejas em função de diferentes programas de amadurecimento utilizando a absorção no infravermelho próximo, e relata que foi possível a distinção entre os programas utilizando esta técnica. GRASSI et al. (2014) monitorou dois tipos de processos de fermentação da cerveja com a técnica de absorção no infravermelho próximo, e descreve que esta técnica tem uma boa relação com os parâmetros de °Brix, pH e biomassa, sendo possível sua utilização no monitoramento da fermentação. A maioria dos estudos até o presente momento são feitos sob a cerveja pronta ou analisando o processo de fermentação e não foi encontrado, durante o desenvolvimento deste trabalho, artigos da aplicação de técnicas espectroscópicas para o estudo do processo de brassagem da cerveja.

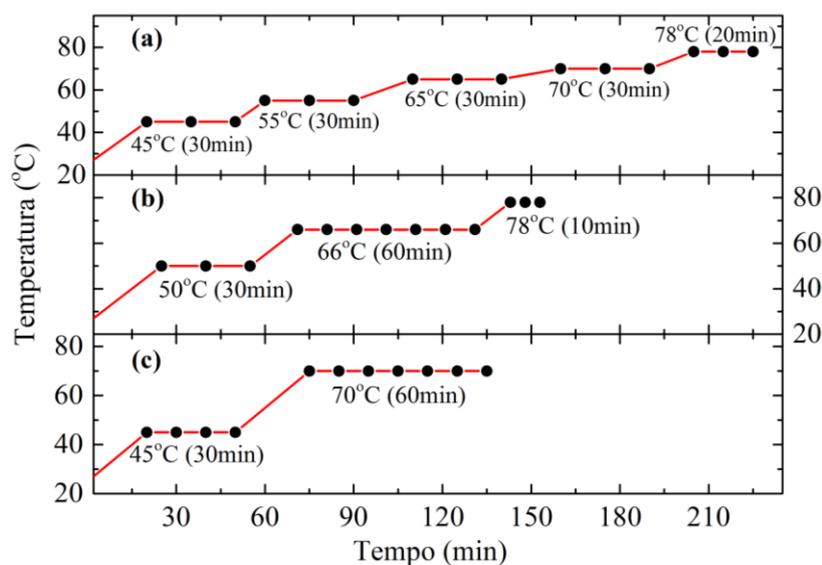
## **2.2- Objetivo**

Devido ao crescimento do comércio de cervejas artesanais juntamente com a busca por técnicas avançadas e confiáveis de análise e monitoramento do processo de fabricação de cervejas, o presente trabalho tem como objetivo utilizar diversas técnicas espectroscópicas para caracterizar a transformação enzimática do amido em açúcares e proteínas que ocorre durante o processo de brassagem da cerveja tipo *pilsen*, pois é um dos principais processos na fabricação, sendo utilizados o método de brassagem com múltiplas rampas.

## **2.3- Materiais e Métodos**

### **2.3.1- Produção da Brassagem**

Os processos de brassagem da cerveja foram realizados em escala laboratorial no Grupo de Espectroscopia Óptica e Fototérmica (GEOF), sendo produzidos três tipos de brassagens diferenciadas pelas rampas de temperatura e tempo de repouso (Figura 2.9). A primeira (Brass I) seguiu-se as temperaturas ideais de atuação das enzimas fundamentais presentes no malte, sendo utilizados no total seis rampas de temperatura (veja Tabela 2.2). Utilizou-se rampas de 45, 55, 65 e 70°C com tempo de repouso de 30 min, e por último uma rampa de 78°C por 20 min utilizada para desnaturação enzimática. A segunda brassagem (Brass II) foi produzida de acordo com a fabricação de cerveja tipo Pilsen, comumente utilizada pelos cervejeiros caseiros, sendo utilizado somente três rampas de temperatura. Para esta brassagem utilizou-se primeiramente uma rampa de 50°C por 30 min, em seguida uma rampa de 66°C por 1 h, e para desnaturação enzimática a rampa de 78°C por 10 min. A terceira brassagem (Brass III) foi produzida de acordo com a tradicional cerveja belga, utilizando apenas duas rampas de temperatura, sendo a primeira de 45°C por 30 min, e a segunda de 70°C por 1 h, não utilizando rampas para desnaturação enzimática, pois este processo é feito à baixa temperatura. Mais detalhes sobre as rampas estão no decorrer da sessão 2.4- Resultados e Discussão. Assim, foram coletadas 15 alíquotas da primeira brassagem, 13 da segunda e 11 da terceira, sendo que estas descrevem todo o comportamento das brassagens utilizadas. Cada tipo de brassagem foi produzida em triplicata.

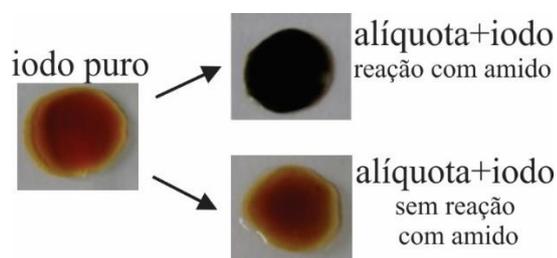


**Figura 2.9-** Programa de temperaturas utilizados na primeira Brassagem (**Brass I**) (a); segunda Brassagem (**Brass II**) (b); e Terceira Brassagem (**Brass III**) (c). Os pontos pretos indicam as alíquotas coletadas.

Toda as brassagens foram produzidas a partir de 450 g de malte tipo Pilsen da empresa Cooperativa Agrária Agroindustrial S.A./Agromalte- Guarapuava, Brasil, e 1,8 L de água destilada. Primeiramente, o malte foi moído em um moedor de cereais para que a casca e o endosperma fossem rompidos, tornando o amido exposto. A água foi acondicionada em um Becker de capacidade de 2 L e o pH foi ajustado para 5 adicionando ácido lático (Sigma, 90%), este pH é o ideal para a atuação enzimática. A leitura do pH foi verificada utilizando indicador de pH (MACHEREY-NAGEL, pH-Fix 0-14). O recipiente com água foi aquecido, e após atingir a primeira rampa de temperatura foi adicionado o malte moído, iniciando imediatamente a coleta da primeira alíquota de amostra, sendo o marco inicial das brassagens. O aquecimento do recipiente foi feito em uma placa aquecedora acoplada a um controlador de temperatura e a um sistema de agitação (72 rpm). Cada alíquota coletada com aproximadamente 5 mL foi acondicionada em tubo de ensaio com tampa, e imediatamente congeladas para que o processo enzimático e outras transformações por temperatura fossem cessadas.

Durante o processo de brassagem para cada alíquota coletada realizou-se o teste de sacarificação do iodo. O teste consistiu em retirar uma gota da alíquota coletada e misturar a uma gota de iodo (Uniphar, solução 2%), para verificar se ocorre ou não uma mudança de coloração. A Figura 2.10 representa um exemplo de como esta comparação visual é realizada. Caso a mistura alíquota+iodo mude de cor comparado com a cor do iodo puro, significa que moléculas de amido ainda estão presente na amostra caso

contrário, tem-se a indicação de que todas as moléculas de amido foram transformadas em subprodutos.



**Figura 2.10-** Exemplos da reação do iodo com alíquotas com amido e sem amido, sendo exemplo do teste de sacarificação. Quando a amostra é composta por amido o iodo muda a cor da mistura se tornando preto, se não ocorre presença de amido a mistura apresentará a mesma cor do iodo puro.

Antes das análises posteriores todas as amostras foram centrifugadas por aproximadamente 20 minutos em uma centrífuga para tubos de ensaio (QUIMIS- Q222T, 34000 rpm) para eliminar as partículas presentes e fornecer uma amostra mais límpida.

### 2.3.2- Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia é uma técnica padrão empregada na avaliação do mosto cervejeiro. Desta forma, utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência para identificar e quantificar os principais açúcares presentes em cada alíquota coletada em cada etapa de brassagem. Primeiramente as amostras foram centrifugadas em uma microcentrífuga refrigerada (NT805, Brasil) (5 minutos, 17609 g, 5°C), o sobrenadante foi retirado e diluído em água destilada (50% v/v). As amostras diluídas foram injetadas no HPLC (Agilent 1290), equipado com coluna Rezex ROA – Organic Acid H<sup>+</sup> (8%) (Phenomenex). A fase móvel utilizada foi ácido trifluoroacético (TFA) a 5 mM, a uma vazão de 0,6 mL min<sup>-1</sup>, com temperatura de 55°C e o volume injetado foi de 20 µL. Estes compostos foram detectados por um detector refratômetro diferencial Agilent 1260 (RID), acoplado a um módulo de aquisição de dados (adaptado FONSECA et al., 2013). Para quantificar e identificar cada açúcar, foram injetadas também amostras padrões de frutose (Sigma-Aldrich, 99%), glicose (Sigma-Aldrich, 99,5%), maltose (Sigma-Aldrich, 99%) e dextrina (Sigma-Aldrich), com 5 concentrações distintas (10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; e 0,31 gL<sup>-1</sup>) para se obter as curvas analíticas de cada um dos padrões (frutose-R<sup>2</sup>=1,000;

glicose- $R^2=0,998$ ; maltose- $R^2=0,999$ ; dextrina- $R^2=1,000$ ). Assim, as áreas obtidas de cada açúcar identificado foram convertidas em concentrações destes açúcares.

### 2.3.2- Medidas do °Brix

O °Brix é determinado pela relação do índice de refração com o teor de açúcar presente nas amostras, por isso é uma medida confiável e comumente utilizado para determinar a quantidade desses compostos. Desta forma, o °Brix foi determinado para cada alíquota coletada de cada brassagem, para monitorar a produção de açúcares durante o processo. Para aquisição dos dados foi utilizado um refratômetro manual com escala Brix (precisão 0,2) (Figura 2.11). Neste aparelho utilizou-se uma gota de 50  $\mu\text{L}$ , dosado com micropipeta, de cada amostra a temperatura ambiente, e assim anotou-se o grau e corrigiu as medidas de acordo com a tabela de correção do Ministério da Agricultura (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2015).

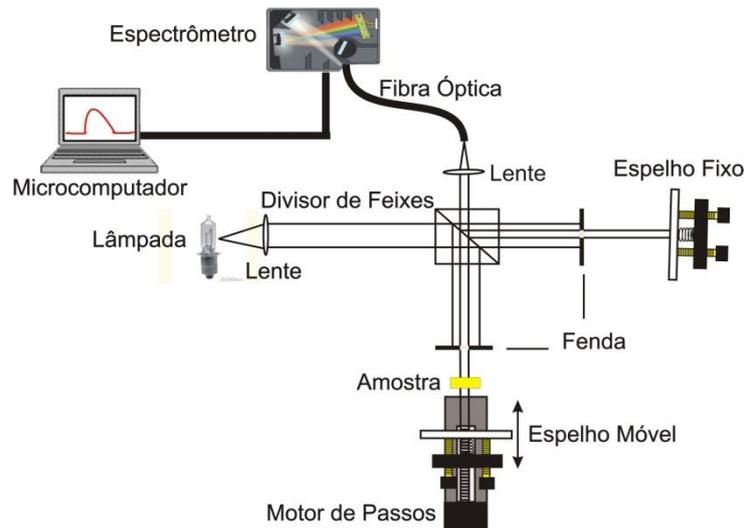


**Figura 2.11-** (a) Refratômetro manual com escala em °Brix. (b) visor indicando o grau Brix.

### 2.3.4- Índice de Refração Espectral

O índice de refração é uma medida confiável que depende do comprimento de onda. Foram coletados o comportamento do índice de refração de cada amostra em função do comprimento de onda, para tanto utilizou-se um interferômetro de Michelson por luz branca de acordo com ROCHA et al. (2016). A Figura 2.12 mostra o aparato experimental. Este experimento consiste em uma fonte de luz branca, um divisor de feixes de simetria cúbica utilizado tanto para dividir os feixes e direcionar o feixe proveniente da fonte até os espelhos quanto para recombinar os feixes refletidos pelos mesmos espelhos que estão fixados em cada braço do interferômetro. Em um dos braços o espelho é mantido fixo, enquanto no outro o espelho é móvel podendo mover 1,0  $\mu\text{m}$  por passo.

Para limitar a região em que a fonte incide na amostra foram postas uma fenda com 3,3 mm de diâmetro em cada braço do interferômetro. Os feixes refletidos e recombinados pelo divisor de feixes são focados na entrada de uma fibra óptica, a qual direciona o sinal de saída até um espectrômetro (Ocean Optics HR4000) que é responsável por processar o sinal e enviar ao microcomputador para aquisição dos dados. Para calibrar o experimento, antes de utiliza-lo com a amostra, transladador linear desloca o espelho a uma posição em que os comprimentos dos braços do interferômetro sejam iguais, sendo a distância percorrida pelo motor a posição inicial ( $L_0$ ). Posteriormente, a amostra acondicionada em uma cubeta de quartzo (0,5 mm), foi posicionada, e o espelho é deslocado até a posição em que o interferograma volte a ser detectado pelo espectrômetro, sendo esta nova distancia  $L$ . Esta posição é definida pelo comprimento de equalização ( $\lambda_0$ ), que é a posição no interferegrama o qual ocorre uma mudança no padrão de interferências. Assim, tem-se a diferença espacial entre os braços do interferômetro ( $\Delta L$ ), que é a diferença entre  $L$  e  $L_0$ . Na posição  $L$  é coletado o sinal do interferograma para a amostra inicial, sendo as demais amostras coletadas na mesmo posição que a amostra inicial.



**Figura 2.12**– Esquema do aparato experimental para determinar o índice de refração (ROCHA et al., 2016).

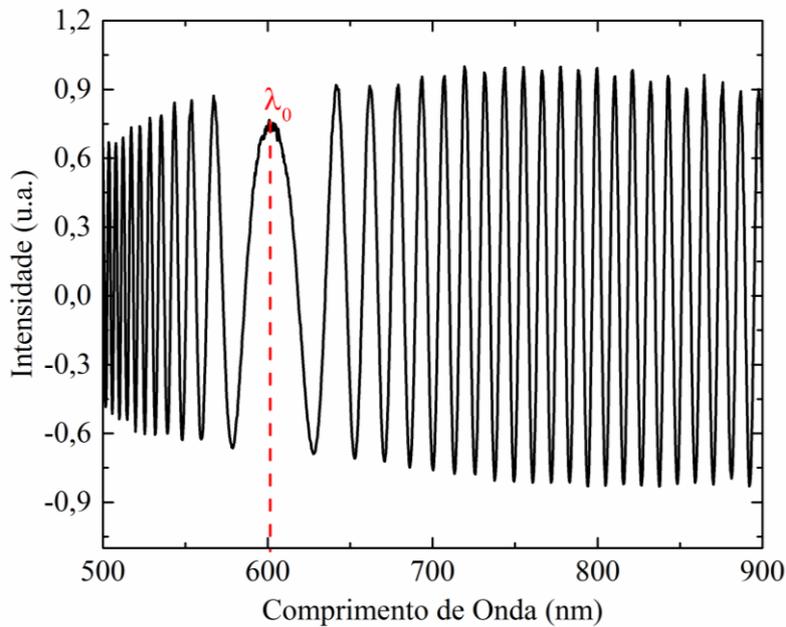
Após a aquisição de todos os interferogramas das amostras estudadas, os sinais foram normalizados pelo sinal da fonte. A Equação 2.1 descreve o interferograma

normalizado em função da dispersão óptica, escrita em termos da série de Cauchy  $A_1 + \frac{A_2}{\lambda^2}$ .

$$S_M(\lambda) = \cos \left\{ \frac{2\pi}{\lambda} \left[ 2\Delta L - 2d \left( A_1 + \frac{A_2}{\lambda^2} - 1 \right) \right] - 2\pi m \right\} \quad (\text{Equação 2.1})$$

sendo  $d$  a espessura da amostra+cubeta e  $m$  um número inteiro.

A série de *Cauchy* descreve o comportamento espectral do índice de refração para uma amostra transparente. O ajuste matemático do interferograma pela equação 2.1 permite obter os parâmetros de  $A_1$  e  $A_2$  e portanto, o índice de refração espectral.



**Figura 2.13-** Interferograma espectral normalizado.

Estes parâmetros obtidos descrevem o comportamento do mosto junto com a cubeta, fazendo-se necessário normaliza-lo pelos parâmetros da cubeta utilizada, como descrito pela Equação 2.2.

$$n(\lambda) = \left( A_{1E} + \frac{A_{2E}}{\lambda^2} \right) \frac{d_A + d_C}{d_A} - \left( A_{1C} + \frac{A_{2C}}{\lambda^2} \right) \frac{d_C}{d_A} \quad (\text{Equação 2.2})$$

sendo  $A_{1E}$  e  $A_{2E}$  são os parâmetros encontrados pelo método de ajuste,  $d_A$  espessura da amostra,  $d_C$  espessura da parede da cubeta;  $A_{1C}$  e  $A_{2C}$  são os parâmetros de *Cauchy* para cubeta.

### 2.3.5- Absorção no Infravermelho Médio

A absorção no infravermelho médio é uma técnica que detecta os modos vibracionais das moléculas quando a frequência da radiação incidente utilizada corresponde a uma das transições entre os níveis vibracionais destas moléculas. Com esta técnica é possível determinar a composição do material estudado, sendo útil na caracterização de materiais (BARBOSA, 2008; COLTHUP et al., 1990). Assim, absorção no infravermelho médio foi utilizada para a caracterização dos modos vibracionais das alíquotas coletadas. As medidas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro por transformada de Fourier (Nexus 870 - Nicolet) acoplado a um detector de refletância total atenuada (ATR - Nexus Smart ARK) no intervalo espectral de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ . Neste intervalo de frequência tem-se a região que apresenta as maiores diferenças espectrais na caracterização das amostras, conhecida como “região de impressão digital” localizada entre 1500 e 650  $\text{cm}^{-1}$ .

Para a aquisição dos espectros foi depositado, através de uma micropipeta, 10  $\mu\text{L}$  da amostra sobre a placa de seleneto de zinco do detector ATR. Devido à alta absorção das moléculas de água na região do infravermelho, elemento básico das amostras estudadas, após colocar a amostra sobre a placa aguardou-se no mínimo 10 minutos para a total evaporação da água, e assim formar um filme de amostra sobre a placa, para garantir que os espectros fossem somente dos componentes de cada amostra sem influência da água. Para esta análise, utilizou-se uma resolução espectral de 4,0  $\text{cm}^{-1}$ , com uma velocidade no espelho de 0,6329  $\text{cm/s}$ , efetuando 64 varreduras (“scans”) em cada medida. Os espectros obtidos foram analisados através do programa computacional Omnic. Foram coletados os espectros das triplicatas de cada tipo de brassagem.

A influência da temperatura e tempo foi verificada utilizando a análise multivariada da variância (MANOVA). Este método estatístico verifica a similaridade entre os grupos estudados detectando relações entre eles, sendo muito utilizada quando existe a influência de muitas variáveis interagindo concomitantemente no processo estudado (BAKER & BAKER, 1984). Para esta análise utilizou-se as intensidades de 16 picos previamente selecionados que correspondem aos principais componentes presentes nas amostras, agrupados de acordo com as rampas de temperatura, cada tipo de brassagem foi analisada separadamente, os gráficos foram representados por PCA (análise de componente principal). Foram verificados dois fatores estatísticos: “F” que avalia a distribuição amostral, sendo que seu valor não tem limites, porém valores próximos de 1

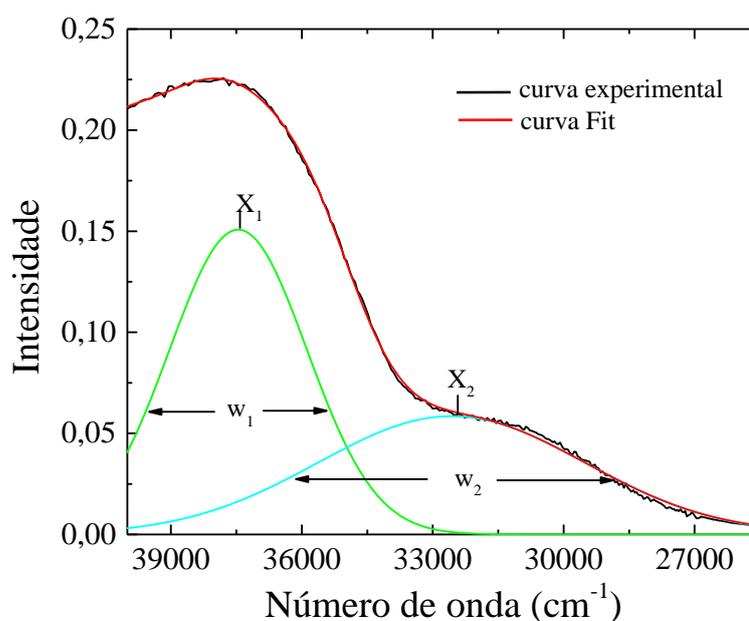
significa que não ocorre diferença entre os grupos, assim quanto maior for seu valor melhor será a separação; “p” indica se a diferença entre os grupos é ou não significativa, sendo que para ser significativo seu valor deve ser  $<0,05$ , ou seja se admite apenas 5% de variação nos dados, valores maiores que este significa que não houve diferença entre os grupos analisados. Para cada pico utilizado a análise estatística fornece um valor de “F” e “p”, sendo possível identificar os picos mais relevantes. Assim, de acordo com a relevância de alguns picos determinados por estes fatores, os mesmos foram utilizados para analisar a distribuição das amostras em cada rampa de temperatura e observar o comportamento de cada pico ao longo das brassagens, para tanto utilizou-se o método de modelo linear generalizado, o qual gerou uma distribuição linear dos dados mostrado em um gráfico com a mediana, primeiro e terceiro quartil.

### **2.3.6- Absorção molecular no Ultravioleta e Visível**

A luz no ultravioleta e visível (UV- Vis) é absorvida pelas moléculas gerando transições eletrônicas, ou seja, as moléculas interagem com a luz e seus elétrons são promovidos de um estado de mais baixa energia para um com maior energia. A intensidade de luz absorvida está relacionada à concentração da amostra, entre outras variáveis. Devido a esta interação, esta técnica é fundamental para caracterização de materiais. Para coletar os espectros de absorção UV-Vis das amostras foi utilizado o espectrofotômetro de absorção molecular no range do ultravioleta e visível (Cary 50 VARIAN). Este equipamento possui uma lâmpada pulsada de Deutério, que é a fonte de excitação; um monocromador Czerny-Turner e dois detectores de diodo de Silício (Manual VARIAN). Devido à alta absorção das amostras no ultravioleta e para evitar saturação, estas foram diluídas (0,5 % v/v) em água destilada. Utilizou-se uma cubeta de 1 cm para acondicionar a amostra durante o experimento, sendo observado a absorção no comprimento de onda de 200 a 800 nm.

Os espectros obtidos por esta técnica foram analisados e para se obter as bandas de absorção optou-se por utilizar o método de deconvolução por gaussianas. Este método consiste em encontrar gaussianas de modo que a soma destas descrevam o espectro encontrado (Figura 2.14). Para tanto faz-se necessário que as gaussianas encontradas para um determinado espectro sejam as mesmas para os demais espectros em termos de largura de meio pico e comprimento de onda central, variando somente a intensidade se for o caso. A forma das gaussianas encontradas e mais detalhes serão discutidos na seção

2.4.2.2- Absorção molecular no Ultravioleta e Visível. As intensidades das gaussianas encontradas foram utilizadas para avaliação estatística. Para isso utilizou-se a análise multivariada de função discriminante, sendo este método utilizado quando precisa-se medir várias variáveis simultaneamente para cada elemento amostral, sendo vantajosa pois tem a função de apontar a qual grupo um elemento tem mais probabilidade de pertencer, assim tende a avaliar a possibilidade de separação de dois ou mais grupos de indivíduos (MANLY, 2008; MINGOTI, 2005). Aplicou-se esta análise para observar a possível separação entre os grupos de rampas de temperatura, sendo utilizado para cada tipo de brassagem separadamente, pois os grupos já são conhecidos, sendo este um pré-requisito para análise. Foram verificados os fatores “F” e “p”, sendo os mesmos fatores descritos para a técnica de absorção no infravermelho. Além disso, a análise resulta em um gráfico de dispersão com o qual pode-se analisar a distribuição dos grupos estudados.



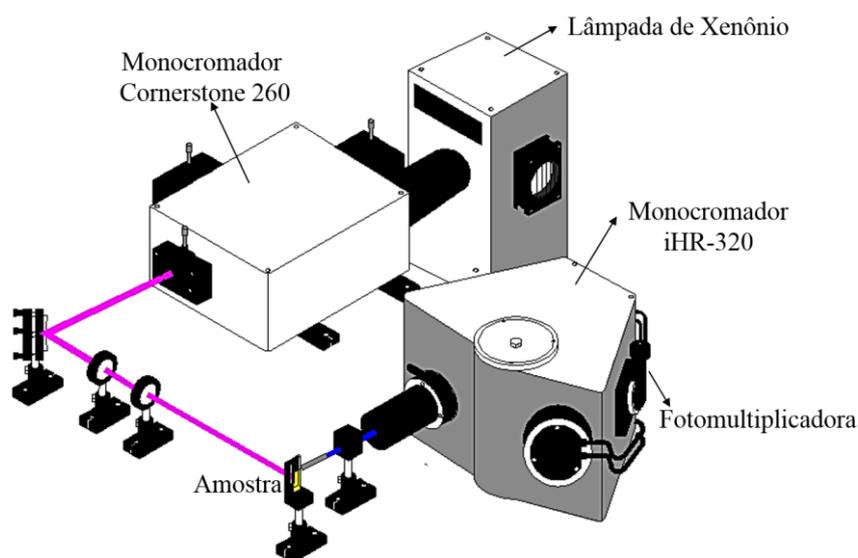
**Figura 2.14-** Exemplo do método de deconvolução do espectro em gaussianas.  $w$  representa a largura de meio pico, e  $X$  o pico central de cada gaussiana encontrada.

### 2.3.7- Fluorescência de excitação e emissão óptica

A luminescência ocorre quando um material é excitado e passa a emitir radiação. A detecção desta radiação é frequentemente utilizada para caracterização de materiais, pois é uma identidade do material estudado, podendo ser usado para quantificar componentes fluorescentes e caracterizar as amostras em nível molecular. Além disso, a

técnica de espectroscopia luminescente é um método rápido, preciso e não destrutivo, conhecido principalmente por sua sensibilidade (SKOOG et al., 2002).

A luminescência das amostras foi determinada utilizando a técnica de excitação e emissão, que é vantajosa para se obter uma análise ampla da amostra estudadas. Para determinar os espectros de excitação e emissão das amostras de cada tipo de brassagem foi utilizado uma lâmpada de Xenônio acoplada a um monocromador (Newport Cornerstone 260™) utilizando rede de difração de 240 linhas/mm e ângulo blaze em 226 nm. A luminescência foi coletada por uma fibra óptica para um segundo monocromador (Horiba Jobin Yvon iHR-320) acoplado a fotomultiplicadora como detector (Figura 2.15). A lâmpada de xenônio apresenta uma banda larga de emissão que por meio do monocromador Newport é difratada de acordo com o comprimento de onda de excitação selecionado. Utilizou-se uma cubeta de 1 mm para acondicionar a amostra durante o experimento, sendo posta perpendicularmente ao feixe da lâmpada de excitação. As amostras foram excitadas de 220 a 400 nm em intervalos de 5 nm e coletados as emissões de 240 a 600 nm, vale ressaltar que testes anteriores foram realizados para obter estes ranges de excitação e emissão dos compostos fluorescentes. O monocromador IHR 320 foi ajustado com abertura de fendas de 2 mm (entrada e saída) e rede de difração de 600 r/mm, tempo de integração de 0,5 s. Após coletados os espectros de emissão, cada um foi normalizado pela intensidade de emissão do feixe de excitação correspondente, proveniente da lâmpada de Xenônio. Em seguida todos os dados foram inseridos em uma matriz para obtenção dos mapas de contorno (excitação/emissão).



**Figura 2.15**– Esquema do aparato experimental de fluorescência.

## 2.4- Resultados e Discussão

### 2.4.1- Análises padrões do processo de brassagem da cerveja

Foram utilizadas três técnicas padrões para análise dos três tipos de brassagens, sendo o teste de sacarificação com iodo, a cromatografia líquida de alta eficiência, e medida do °Brix.

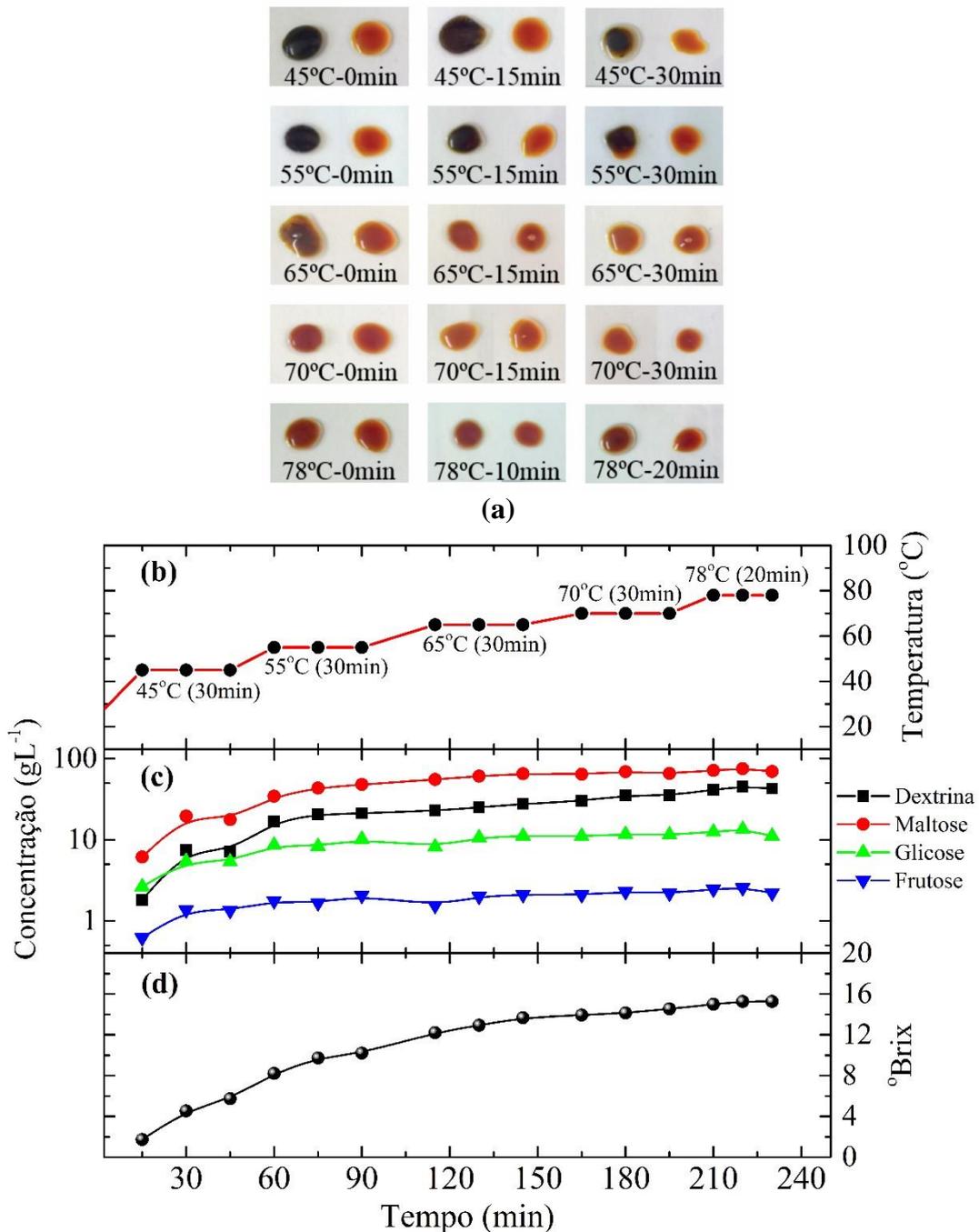
#### 2.4.1.1- Primeira Brassagem

A primeira brassagem (**Brass I**) seguiu as temperaturas ótimas para a ação das principais enzimas presentes no malte, mostrado na Tabela 2.2. As rampas utilizadas são mostradas na Figura 2.16(b), sendo os pontos representando as coletas em cada rampa. Utilizou-se repouso de 30 min nas rampas de 45°C a 70°C, sendo a rampa de 45°C utilizada para observar a ação das enzimas hemilcelulase e protease, que quebra a hemicelulose em dextrina e proteínas de alto peso molecular em proteínas de médio e baixo peso molecular (exemplo: aminoácidos), respectivamente. A 55°C a protease continua atuante, e nesta temperatura é ativada a enzima dextrinase que atua no amido transformando-o em maltose (união de duas glicoses) e maltotriose (união de três glicoses). Na rampa de 65°C atua-se a  $\beta$ -amilase que quebra o amido principalmente em maltose, e em 70°C atua a  $\alpha$ -amilase que transforma o amido principalmente em dextrina, sendo a última enzima atuante do processo. Para a rampa de 78°C utilizou-se repouso de 20 min, pois esta temperatura é utilizada para desnaturação das enzimas, e por isso a utilização de tempos entre 5 e 20 min são suficientes.

Durante o processo de brassagem foram realizadas o teste de sacarificação com iodo, este teste é muito utilizado por mestre cervejeiros caseiros, sendo utilizado por eles somente ao final da rampa de sacarificação (em torno de 65°C). O teste foi feito em cada amostra coletada do mosto, sendo observado a mudança de cor, ou não, da mistura iodo+amostra, o resultado da primeira brassagem é mostrado na Figura 2.16(a), sendo este a média das triplicatas. Os resultados revelaram que o iodo reage com o amido até a amostra de 65°C-0min, onde a cor da mistura iodo+amostra é escura, após a amostra 65°C-15min observa-se que o iodo não reage mais com a alíquota, pois a mistura iodo+amostra permaneceu com a cor próxima do iodo puro, assim podemos inferir que a partir desta amostra temos mais açúcares do que amido presentes.

Apesar do teste de coloração por iodo poder fornecer informações sobre a presença do amido no mosto, este não nos permite dizer que a sacarificação tenha chegado ao fim, pois quando a enzima  $\alpha$ -amilase começa a agir no mosto o iodo não detecta o amido devido a ação desta enzima degradar o amido facilmente em moléculas de dextrina. E a dextrina ainda pode ser aproveitada pelas enzimas, principalmente a  $\beta$ -amilase, para ser transformada em maltose, que é o principal açúcar consumido pelas leveduras na etapa de fermentação da cerveja. Assim testes complementares que permitam quantificar outros açúcares presentes no mosto são necessários.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizada para verificar a presença dos principais açúcares e as quantidades produzidas em cada brassagem. Foram identificados quatro tipos de açúcares: maltose, glicose, frutose e dextrina. A evolução da concentração desses açúcares durante o processo é mostrado na Figura 2.16(c). Observa-se que a frutose é o açúcar de menor concentração, iniciando com  $0,62 \text{ gL}^{-1}$  (em  $45^{\circ}\text{C}$ -0min), este valor inicial indica a quantidade de açúcar já existente no malte moído, pois esta amostra foi coletada imediatamente após a mistura do malte em água à  $45^{\circ}\text{C}$ , isso também ocorre para os demais açúcares identificados. A frutose é extraída desde os 15 min da rampa de  $45^{\circ}\text{C}$  ( $1,3 \text{ gL}^{-1}$ ) até o início da rampa de  $65^{\circ}\text{C}$ , permanecendo estável até o fim do processo, que é finalizado com  $2,56 \text{ gL}^{-1}$  (em  $78^{\circ}\text{C}$ -20min). A glicose também é produzida em pequenas quantidades, iniciando em  $2,65 \text{ gL}^{-1}$  (em  $45^{\circ}\text{C}$ -0min), produzindo  $5,46 \text{ gL}^{-1}$  na metade da primeira rampa, e tendo um crescimento maior até o final da rampa de  $65^{\circ}\text{C}$  ( $12,53 \text{ gL}^{-1}$ ), após esta etapa a variação é pequena e ocorre até o início de  $78^{\circ}\text{C}$ , finalizando o processo com  $13,44 \text{ gL}^{-1}$  (em  $78^{\circ}\text{C}$ -20min). Tanto a frutose quanto a glicose são consumidos como alimento pelas leveduras no processo de fermentação, porém existe um fator limitante, as leveduras comumente utilizadas na cerveja consomem glicose e frutose primeiro e enquanto não são consumidos aproximadamente 50% desses açúcares o consumo dos demais açúcares, como a maltose, não se inicia (STEWART, 2009). Por isso altas concentrações de glicose e frutose são um fator negativo na brassagem.



**Figura 2.16-** (a) Imagens do Teste de iodo feito para cada amostra coletada na **Brass I**, representando uma média das triplicatas, para cada amostra a imagem à esquerda corresponde a mistura de iodo+amostra, sendo a imagem à direita somente iodo, para comparação da cor. (b) Representação das rampas de temperatura utilizada na primeira brassagem, sendo os pontos indicativo das alíquotas coletadas em cada rampa. (c) Progressão das médias das concentrações dos açúcares identificados pela cromatografia líquida nesta brassagem; (d) Média do °Brix medido em cada amostra coletada.

O mosto apresenta inicialmente 1,80 gL<sup>-1</sup> de Dextrina (em 45°C-0min), sendo produzido 7,46 gL<sup>-1</sup> nos primeiros 15 min da primeira rampa (45°C). A maior produção ocorre nas rampas de 55 e 65°C atingindo ao final 27,75 gL<sup>-1</sup>, mas a produção ainda

continua e o processo é finalizado com  $42,60 \text{ gL}^{-1}$ ; as duas últimas rampas ( $70$  e  $78^\circ\text{C}$ ) favorecem a enzima  $\alpha$ -amilase que quebra o amido formando dextrina, por isso este açúcar continua sendo formado. A dextrina é o tipo de açúcar não-fermentável, pois não é consumido pelas leveduras, sendo fundamental para o corpo da cerveja, porém em concentrações maiores que a dos açúcares fermentáveis gera uma deficiência no processo de fermentação, ou seja no rendimento de álcool gerado pelas leveduras. A maltose apresenta a maior concentração inicial,  $6,16 \text{ gL}^{-1}$  (em  $45^\circ\text{C}$ -0min), produzindo  $19,61 \text{ gL}^{-1}$  na metade da primeira rampa (em  $45^\circ\text{C}$ -15min). Nesta rampa ocorre a atuação da  $\alpha$ -glicosidase quebrando de forma lenta o amido em dextrina, maltose e maltotriose (BRIGGS et al., 2004). A maior extração ocorre nas rampas de  $55$  e  $65^\circ\text{C}$  ( $65,04 \text{ gL}^{-1}$ ) com a ação da dextrinase e  $\beta$ -amilase. Na próxima rampa ( $70^\circ\text{C}$ ) a extração de maltose continua com a ação da  $\alpha$ -amilase, tendo uma baixa extração pois esta enzima gera principalmente dextrina, assim ao final do processo tem-se  $75,40 \text{ gL}^{-1}$  de maltose. Este açúcar é o mais abundante na cerveja, por isso as leveduras utilizadas em todos os processos de fermentação de cerveja (gênero *Saccharomyces*) consomem a maltose como seu principal alimento para a transformação em álcool (BRIGGS et al., 2004; STEWART, 2009). Com as concentrações principalmente de maltose tem-se uma base do teor alcoólico que terá a cerveja, pois valores menores de maltose tem-se uma cerveja menos alcoólica.

Uma das medidas mais utilizadas para monitorar a brassagem em tempo real, principalmente por cervejeiros caseiros, é o °Brix. Este grau mede principalmente a quantidade de açúcares presente na amostra, sendo muito utilizado nas indústrias de sucos e produtos similares (BALL, 2006; DONGARE et al., 2015). Enquanto o teste do iodo qualifica a ausência do amido, esta medida representa o aumento de açúcares, sendo assim o inverso do teste com o iodo. A Figura 2.16(d) mostra os índices de °Brix para cada amostra desta brassagem. Observa-se um aumento, crescendo de  $1,7$  até  $15,3$  °Brix. Este valor concorda com os valores indicados para uma boa fermentação, principalmente para o tipo de cerveja Lager que utiliza leveduras de baixa fermentação (*Saccharomyces cerevisiae*), pois estas leveduras consomem todos os açúcares sem dificuldades (CHARLES, 2006; STEWART, 2009). O °Brix é utilizado para calcular também a quantidade de leveduras que será utilizado na etapa de fermentação (MUNROE, 2006), quanto maior o grau, maior a quantidade de açúcar fermentáveis, portanto será necessária uma maior quantidade de cepas de leveduras, se desejar uma cerveja mais alcoólica e

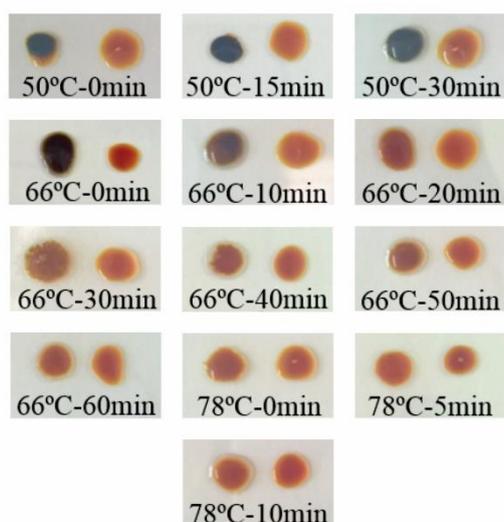
menos adocicada. Assim, com o °Brix tem-se a noção do grau alcoólico que terá a cerveja produzida com este mosto, se as leveduras atuarem eficientemente.

#### 2.4.1.2- Segunda Brassagem

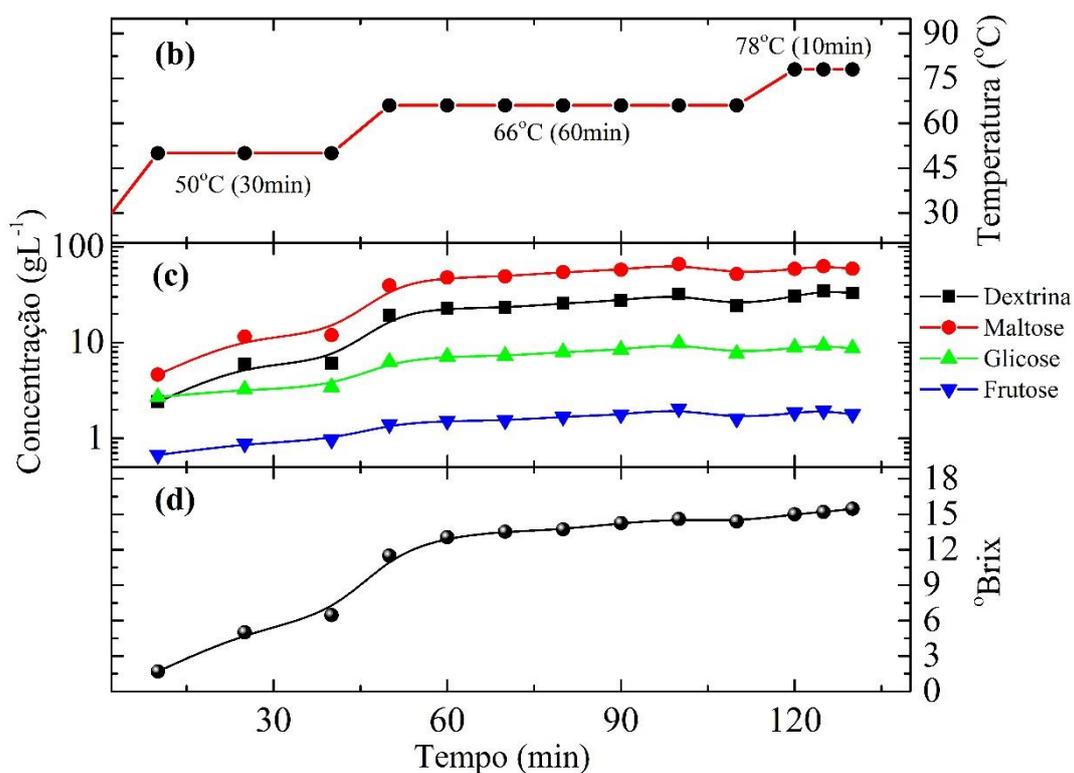
A segunda brassagem (**Brass II**) foi realizada de acordo com o padrão de fabricação de cerveja Pilsen (BRANDAM et al., 2003). Para a fabricação deste mosto utiliza-se somente duas rampas de temperatura para extração dos produtos desejáveis (Figura 2.17(b)). A primeira rampa é de 50°C com tempo de repouso de 30 min, a qual ativa a enzima dextrinase que extrair maltose e maltotriose, e a protease que extrai principalmente os aminoácidos. A segunda rampa é de 66°C com tempo de 60 min, sendo ativado a  $\beta$ -amilase para produção principalmente de maltose. A rampa de desnaturação das enzimas foi de 78°C por apenas 10 min.

A Figura 2.17(a) mostra o resultado do teste do iodo para cada amostra desta brassagem. Nesta brassagem o iodo reage com o amido até os 10 min da rampa de 66°C, nas amostras seguintes não ocorre a mudança de cor para a mistura de iodo+amostra, indicando que não existe quantidade suficiente de amido para reagir.

Com a cromatografia obteve-se os mesmos açúcares visto para **Brass I**, sendo a progressão das concentrações destes açúcares representado na Figura 2.17(c). Observa-se que a frutose teve concentração inicial de 0,60 gL<sup>-1</sup> e finalizou com 1,94 gL<sup>-1</sup>, a glicose produziu inicialmente 2,70 gL<sup>-1</sup> e finalizou com 9,28 gL<sup>-1</sup>, estes açúcares tiveram um maior índice na primeira rampa (50°C), e permanecem constantes durante o restante do processo. A concentração de dextrina cresce durante toda a brassagem, iniciando com 2,40 gL<sup>-1</sup> e finalizando com 34,64 gL<sup>-1</sup>. A maltose apresentou um maior crescimento, iniciando com 4,64 gL<sup>-1</sup> e finalizando com 62,84 gL<sup>-1</sup>.



(a)



**Figura 2.17-** (a) Imagens do Teste de iodo feito para cada amostra coletada na **Brass II**, representando uma média das triplicatas, para cada amostra a imagem à esquerda corresponde a mistura de iodo+amostra, sendo a imagem à direita somente iodo, para comparação da cor. (b) Representação das rampas de temperatura utilizada na segunda brassagem, sendo os pontos indicativo das alíquotas coletadas em cada rampa. (c) Progressão das médias das concentrações dos açúcares identificados pela cromatografia líquida nesta brassagem; (d) Médias do °Brix medido em cada amostra coletada.

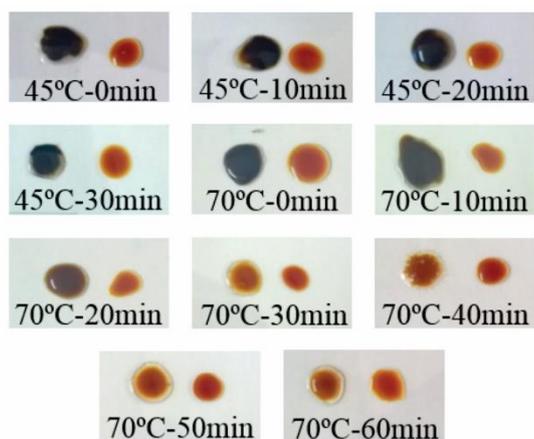
Comparando com **Brass I**, em relação as concentrações iniciais observamos que se obtém aproximadamente as mesmas para glicose e frutose, porém a maltose e a

dextrina apresentaram valores distintos. Pode-se inferir que ao iniciar o processo com uma temperatura mais elevada pode prejudicar a gelatinização do amido e dos açúcares já presentes no malte, gerando índices menores destes açúcares. Em relação as concentrações finais esta brassagem tem menores índices de maltose e dextrina, isso ocorre por vários motivos, primeiramente na **Brass I** a rampa de 45°C é utilizada para gelatinização do amido, processo pelo qual o amido é solubilizado, nesta temperatura ocorre também a ativação da  $\alpha$ -glicosidase, que quebra o amido em maltose, dextrina, entre outros açúcares, enquanto que na **Brass II** se utiliza 50°C, a esta temperatura se ativa a dextrinase, assim como o amido ainda está em fase de solubilização, esta enzima não tem tantos ramos para quebrar. Quando a **Brass I** está na rampa de 55°C que ativa a dextrinase já existe amido solubilizado suficiente para uma ação mais eficaz. Podemos verificar isso com as concentrações de maltose e dextrina geradas nessas rampas, para **Brass I** quando termina a rampa de 55°C, após passar pela de 45°C, o índice de maltose e dextrina são de 48,15 e 21,23 gL<sup>-1</sup>, respectivamente, enquanto que para **Brass II** 12,00 e 6,11 gL<sup>-1</sup>, respectivamente. Outro fator é a não utilização da rampa de 70°C, que ativa de forma mais eficiente a enzima  $\alpha$ -amilase. A Figura 2.17(d) mostra os índices de °Brix para cada amostra desta brassagem, observa-se que o índice cresce de 1,7 até 15,0 °Brix, o mesmo encontrado na **Brass I**. De acordo com este índice, esta brassagem também é ideal para se obter uma boa cerveja Lager.

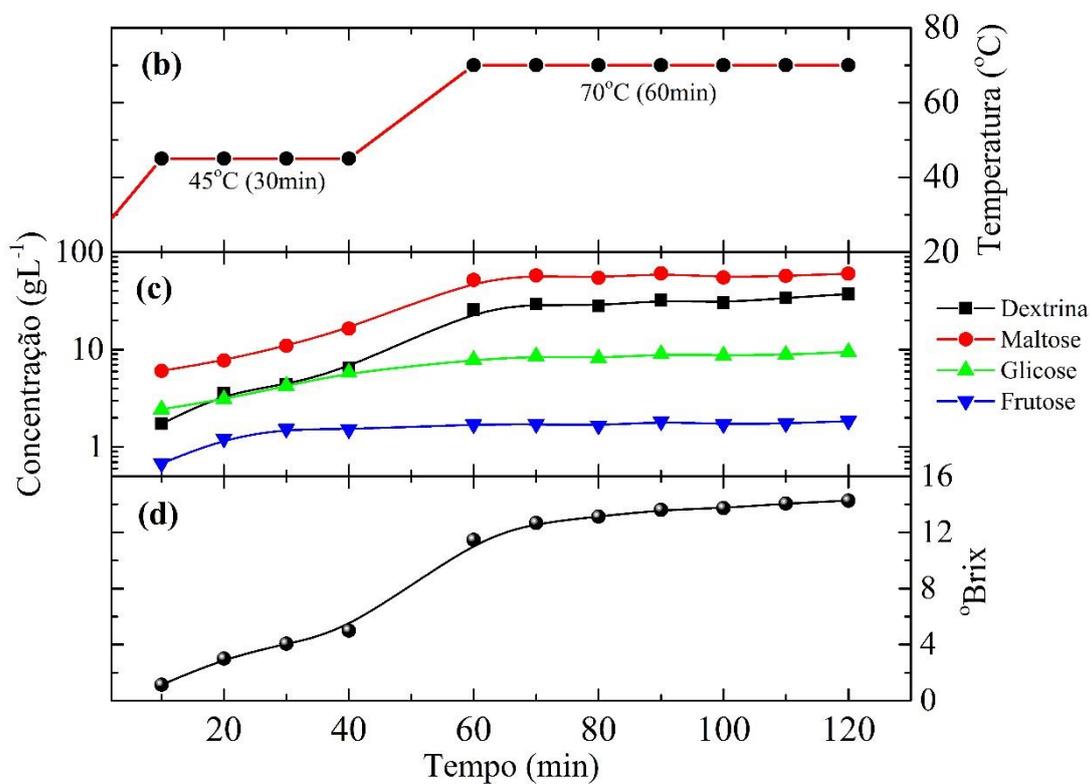
#### 2.4.1.3- Terceira Brassagem

A terceira brassagem (**Brass III**) foi realizada de acordo com o estilo padrão de fabricação de cerveja belga. Neste processo o mosto é produzido utilizando somente duas rampas de temperatura (Figura 2.18(b)). A primeira rampa é de 45°C com tempo de 30 minutos, na qual ativa a enzimas hemilocelulase que extrai principalmente dextrina, e a protease que extrai os aminoácidos. A segunda rampa é de 70°C com tempo de 60 minutos, sendo ativado a  $\alpha$ -amilase para produção de dextrina, e a  $\beta$ -amilase para produção de maltose e maltotriose. Neste tipo de brassagem não se utiliza rampa de desnaturação das enzimas, sendo feito somente o resfriamento do mosto após a última rampa de temperatura. A Figura 2.18(a) mostra o teste de iodo para esta brassagem, o qual indica que não ocorre a presença de moléculas de amido após a amostra de 70°C - 20min.

A Figura 2.18(c) mostra o resultado da cromatografia para a terceira brassagem (**Brass III**), sendo encontrado os mesmos açúcares vistos nas demais brassagens. Observa-se que a frutose teve concentração inicial de  $0,67 \text{ gL}^{-1}$  e finalizou com  $1,85 \text{ gL}^{-1}$ . Já a glicose produziu inicialmente  $2,44 \text{ gL}^{-1}$  e finalizou com  $9,47 \text{ gL}^{-1}$ . A dextrina cresce durante toda a brassagem, iniciando com  $1,73 \text{ gL}^{-1}$  e finalizando com  $37,15 \text{ gL}^{-1}$ . A maltose tem o maior crescimento, iniciando com  $6,05 \text{ gL}^{-1}$  e finalizando com  $60,14 \text{ gL}^{-1}$ . Em comparação com as demais brassagens, a glicose e a frutose têm aproximadamente as mesmas concentrações. Esta brassagem também tem concentrações menores de maltose e dextrina quando comparado com **Brass I**, e tem aproximadamente as mesmas encontradas na **Brass II**, isso pode ser explicado pela utilização de somente uma rampa para a sacarificação do malte. Apesar de **Brass II** utilizar a rampa de sacarificação que prioriza a enzima  $\beta$ -amilase gerando nesta etapa um índice maior de maltose, a utilização da rampa de  $50^\circ\text{C}$  para gelatinização não beneficia de forma igual esta produção. Como **Brass III** utiliza a rampa de  $45^\circ\text{C}$  para uma maior gelatinização e ativação da  $\alpha$ -glicosidase, gera nesta etapa mais maltose, assim a utilização da rampa de  $70^\circ\text{C}$  para sacarificação como prioridade a ativação da  $\alpha$ -amilase não deixa de ter uma produção de maltose e dextrina satisfatória. A Figura 2.18(d) mostra os índices de  $^\circ\text{Brix}$  para cada amostra desta brassagem, observa-se que o índice cresce de 1,5 até  $14,3 \text{ }^\circ\text{Brix}$ , sendo menor que o verificado na Brass I e II, devido à natureza desta medida, ela não mede somente os açúcares apresentados podendo estar sendo influenciada por outros açúcares como a sacarose. Este índice indica que o mosto pode ser utilizado para fazer uma cerveja tipicamente belga.



(a)



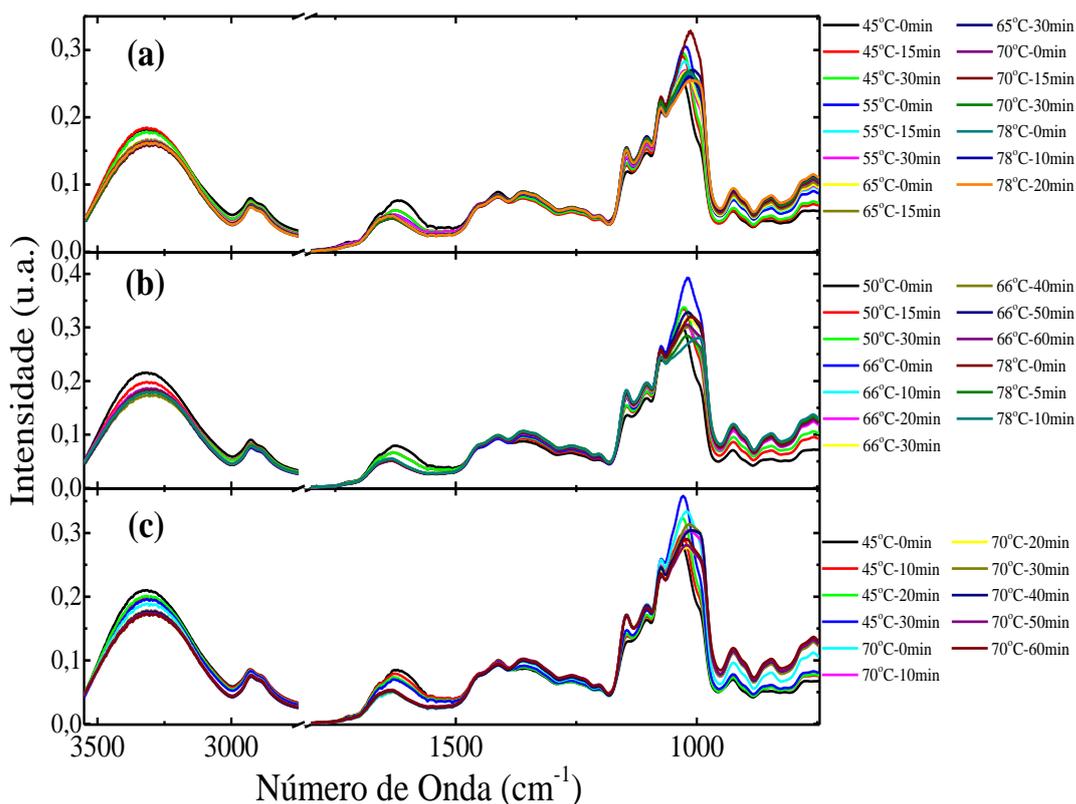
**Figura 2.18-** (a) Imagens do Teste de iodo feito para cada amostra coletada na **Brass III**, representando uma média das triplicatas para cada amostra a imagem à esquerda corresponde a mistura de iodo+amostra, sendo a imagem à direita somente iodo, para comparação da cor. (b) Representação das rampas de temperatura utilizada na terceira brassagem, sendo os pontos indicativo das alíquotas coletadas em cada rampa. (c) Progressão das médias das concentrações dos açúcares identificados pela cromatografia líquida nesta brassagem; (d) Média do °Brix medido em cada amostra coletada.

## **2.4.2- Espectroscopia aplicada ao monitoramento da etapa de Brassagem**

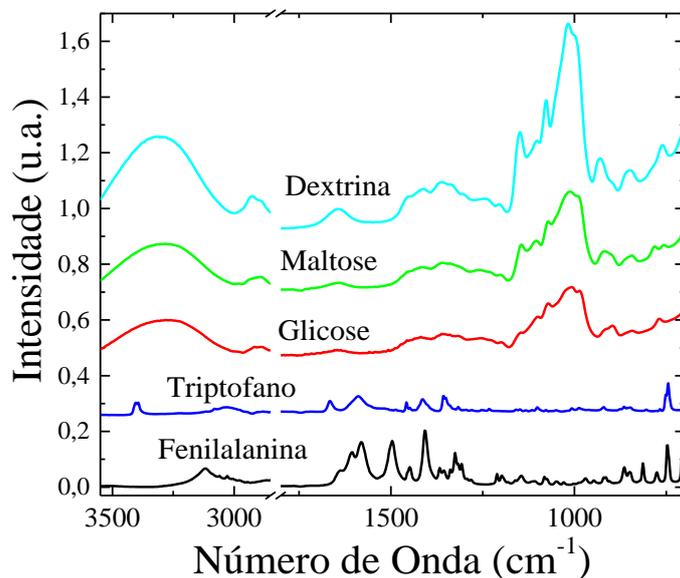
A composição do mosto produzido pela etapa de brassagem é altamente complexo com presença de milhares de componentes, o que dificulta a análise completa de todos os componentes. Os principais componentes gerados nesta etapa são: açúcares fermentáveis (maltose, maltotriose, frutose, glicose, sucrose) e não fermentáveis (dextrina), aminoácidos (triptofano, fenilalanina, tirosina),  $\beta$ -glucanos, pentosans, fosfatos, ions inorgânicos dissolvidos, proteínas, peptídeos, lipídeos, substâncias fenólicas entre outras (BRIGGS et al., 2004). Um mosto típico contém aproximadamente 90-92% de carboidratos e 4-5% de substâncias nitrogenadas (BRIGGS et al., 2004; MacWILLIAM, 1968). Os processos de brassagem foram monitorados com as seguintes técnicas espectroscópicas: absorção óptica no infravermelho médio, absorção no ultravioleta-visível, índice de refração espectral, e fluorescência de excitação e emissão óptica.

### **2.4.2.1- Absorção no Infravermelho médio**

Primeiramente utilizou-se a técnica de absorção no infravermelho médio para analisar as amostras coletadas de cada brassagem. A Figura 2.19 mostra a média dos espectros obtidos com as três brassagens, e a Figura 2.20 os espectros dos padrões de alguns açúcares (maltose, glicose, dextrina) e aminoácidos (fenilalanina e triptofano). Analisando as figuras, os espectros das brassagens refletem principalmente os açúcares presentes no mosto, e não apresentam picos relevantes que possam identificar a presença de aminoácidos nas amostras. Assim, a técnica de FTIR é relevante para análise de açúcares presente na brassagem. A região de 1500 a 700  $\text{cm}^{-1}$  é conhecida como região dos carboidratos.



**Figura 2.19-** Absorção no Infravermelho médio das amostras da **Brass I (a); Brass II (b); e Brass III (c).**

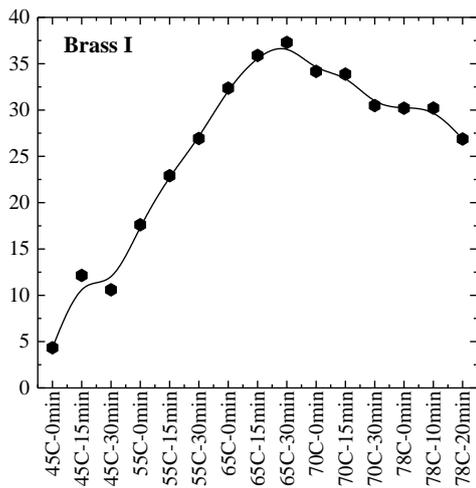


**Figura 2.20-** Absorção no Infravermelho médio de padrões P.A. dos açúcares Maltose, Glicose e Dextrina, e dos aminoácidos Triptofano e Fenilalanina.

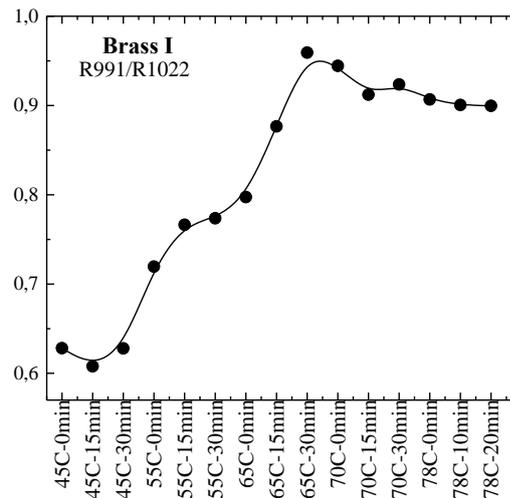
Nos espectros das amostras da **Brass I** observamos que os espectros são semelhantes, ocorrendo algumas diferenças somente na região dos carboidratos. A principal mudança ocorre entre as bandas centradas em 1022 e 991  $\text{cm}^{-1}$ , sendo referentes

a dextrina e maltose, respectivamente. Nas rampas de 45°C até o final da rampa de 65°C (30 min) ocorre uma maior absorção na região de 1022 cm<sup>-1</sup>, após este tempo de brassagem as bandas de 991 cm<sup>-1</sup> e 1022 cm<sup>-1</sup> modificam suas intensidades tornando a banda de 1022 cm<sup>-1</sup> menos intensa. A Figura 2.21(a) e (b) mostra a relação entre as concentrações da maltose e dextrina obtidas na cromatografia e a razão entre o pico 1022 e 991 cm<sup>-1</sup>, respectivamente; observamos que exatamente no ponto de 65°C-30min da brassagem as curvas de ambas as técnicas mudam seus comportamentos. Sendo assim, pode-se inferir que estas bandas revelam o comportamento da produção de açúcares pela brassagem. Para a **Brass II** isso ocorre somente depois da amostra 66°C-50min (Figura 2.21(c) e (d)), e para **Brass III** em 70°C-10min (Figura 2.21(e) e (f)). Em todos os casos, a mudança ocorre entre as ativações das enzimas β-amilase e α-amilase, ou seja, quando ocorre a produção de maltose e dextrina, respectivamente. Desta forma, essas bandas podem dar informações sobre a produção desses açúcares os quais são importantes para o monitoramento da brassagem.

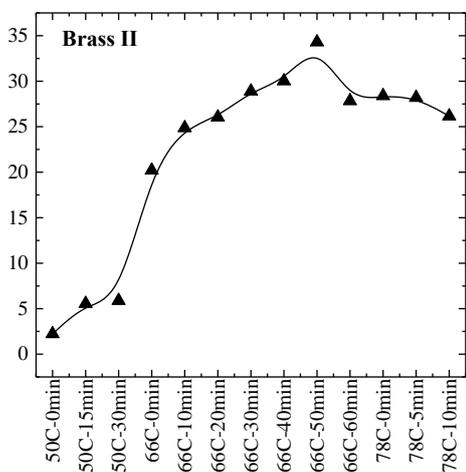
Devido as semelhanças entre os espectros é difícil visualmente ver as demais diferenças que ocorrem entre eles. Por isso, foram selecionados 16 picos mais relevantes para serem usados nos métodos estatísticos, estes picos estão representados na Figura 2.21. Os picos 1230, 1145, 1103, 1074, 991, 923 e 757 cm<sup>-1</sup> referem-se a presença da maltose, este açúcar tem como pico característico o 1145 e 991 cm<sup>-1</sup>. A dextrina aparece nos picos 1659, 1361, 1022 e 844 cm<sup>-1</sup>, tendo 1022 cm<sup>-1</sup> como pico característico. A Sacarose aparece principalmente no pico 923cm<sup>-1</sup>, e a frutose nos picos 1413 e 1259 cm<sup>-1</sup>. Os picos 3315, 2927 e 2882 cm<sup>-1</sup> existem na maioria dos açúcares, pois estes têm os espectros semelhantes.



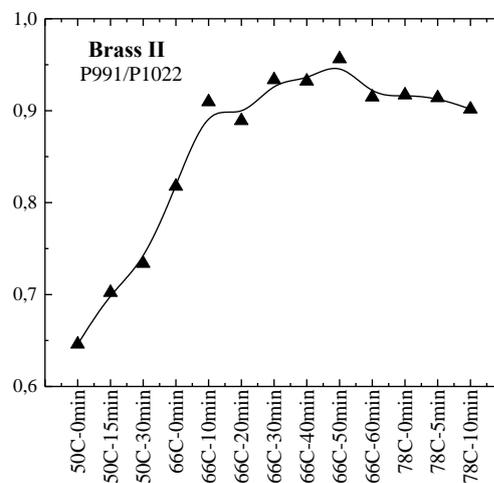
(a)



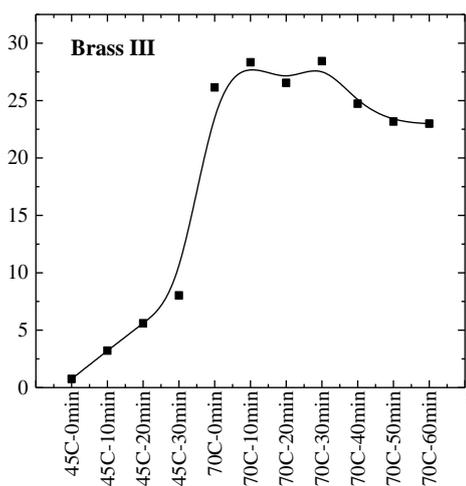
(b)



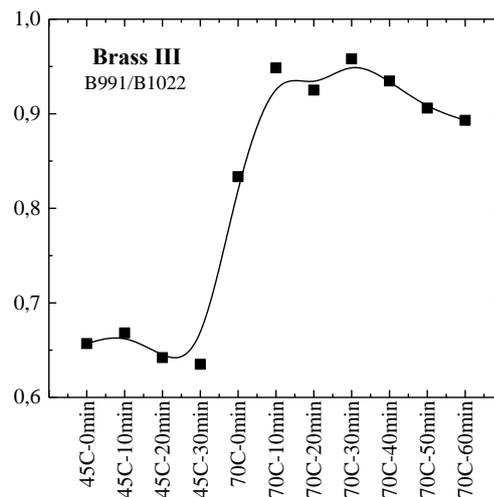
(c)



(d)

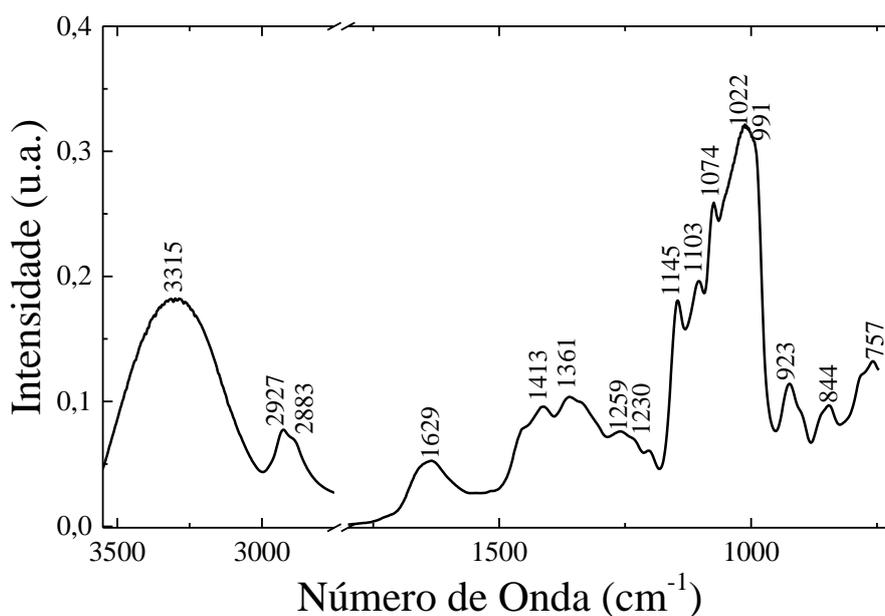


(e)



(f)

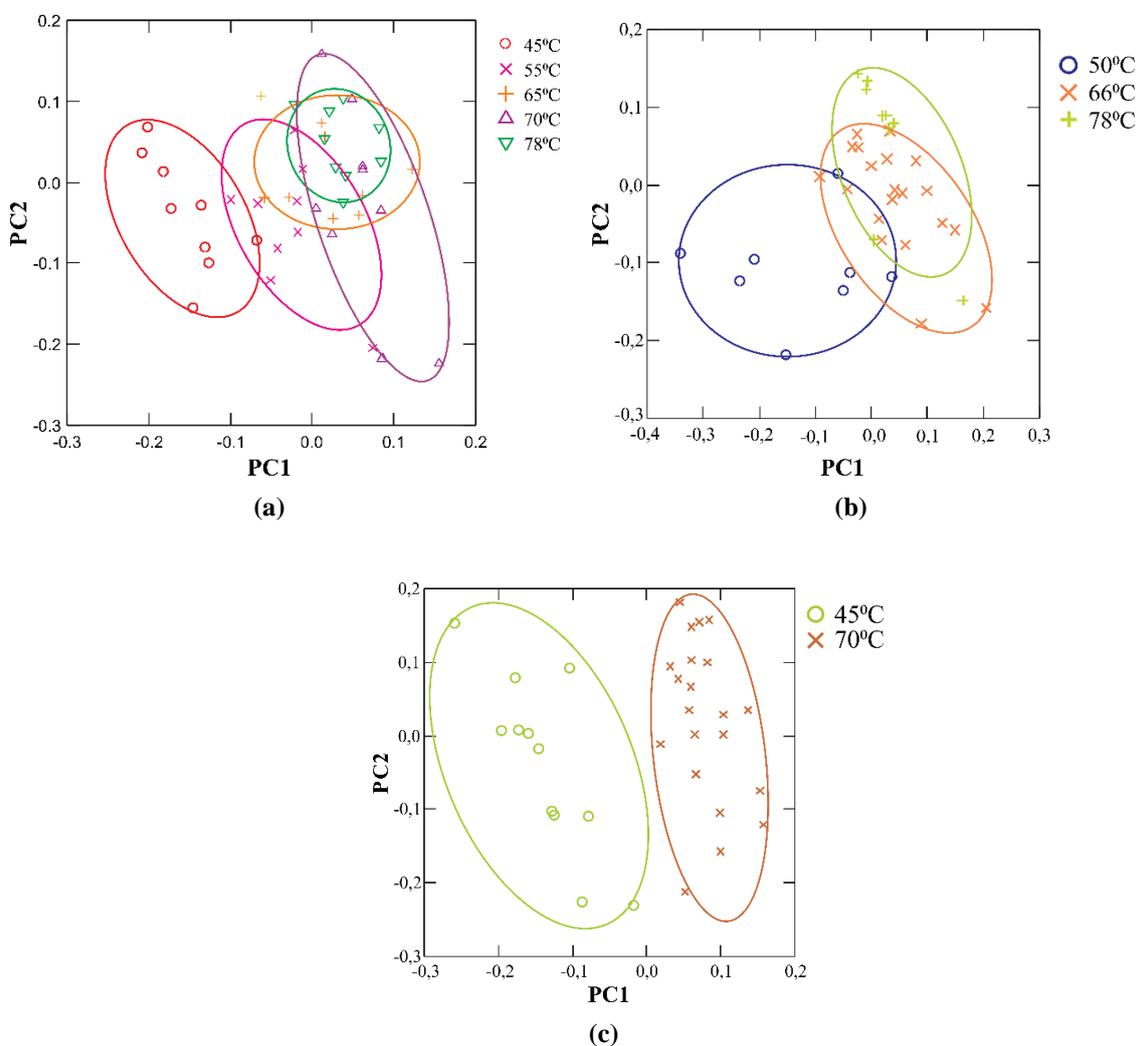
**Figura 2.21-** Relações entre a concentração de maltose e dextrina com dados obtidos na cromatografia, e razão entre as intensidades das bandas de 1022 e 991cm<sup>-1</sup>, respectivamente, (a) e (b) referentes a primeira brassagem; (c) e (d) referentes a segunda brassagem; (e) e (f) referentes a terceira brassagem.



**Figura 2.22-** Espectro da amostra 65°C-0min da **Brass I** indicando os picos selecionados para as análises estatística.

Para análise estatística utilizou-se o método MANOVA para verificar a relação entre as temperaturas e tempo de cada tipo de brassagem, e foram utilizados os picos selecionados. A variável tempo não foi significativo em nenhuma das brassagens:  $p=0,896$  para Brass I;  $p=0,885$  para Brass II;  $p=0,329$  para Brass III. A Figura 2.23 mostra as PCA de cada brassagem de acordo com os grupos de temperaturas por ser a única variável que foi significativa na análise, e na Tabela 2.4 os valores de F e p para cada pico. Para **Brass I**, o eixo PC1 explica 66% da variação, e observa-se um gradiente entre as rampas neste eixo, ocorrendo uma sobreposição entre as rampas de 70 e 78°C, explicado pelo fato da rampa de 78°C ser somente utilizada para a desnaturação das enzimas e não mais para a extração de açúcares. Outra sobreposição ocorre com a rampa de 65°C que se sobrepõe à de 55 e 70°C, indicando as intensidades dos picos para estas amostras são semelhantes, e podemos inferir que nestas rampas ocorrem a produção dos mesmos açúcares sendo a variação somente em concentração. Os picos que tiveram maiores influencias na diferenciação foram 757, 844, 1145, 1629 e 2927  $\text{cm}^{-1}$ . Para **Brass II**, o eixo PC1 explicou 49% da variação e neste eixo somente a primeira rampa de temperatura (50°C) se separa das demais. A rampa de sacarificação (66°C) é a única utilizada para extração dos açúcares favorecendo mutuamente várias enzimas, no gráfico se mistura com a rampa de desnaturação (78°C), por isso não ocorre a distinção. Os picos que influenciaram na diferenciação foram 757, 844, 923, 1145 e 1629  $\text{cm}^{-1}$ . Para **Brass**

**III**, o eixo PC1 explicou 71% da variação, devido a utilização de somente duas rampas de temperatura, os grupos ficam totalmente isolados, refletindo a diferença entre a rampa inicial que extrai poucos açúcares e a final que deve extrair vários açúcares diferentes ao mesmo tempo. Os picos que influenciaram na diferenciação foram 757, 844, 923, 1145, 1629, 2883 e 2927  $\text{cm}^{-1}$ . Em nenhuma das análises os picos de 1022 e 991  $\text{cm}^{-1}$  foram relevantes para a diferenciação entre os grupos, isso pode ter ocorrido pelo fato deles representarem somente a transição entre as produções de maltose e dextrina. Comparando as três PCA das brassagens temos a maior distinção entre as rampas de temperatura na **Brass I**, refletindo o uso de rampas de temperaturas adequadas a ação de cada enzima.



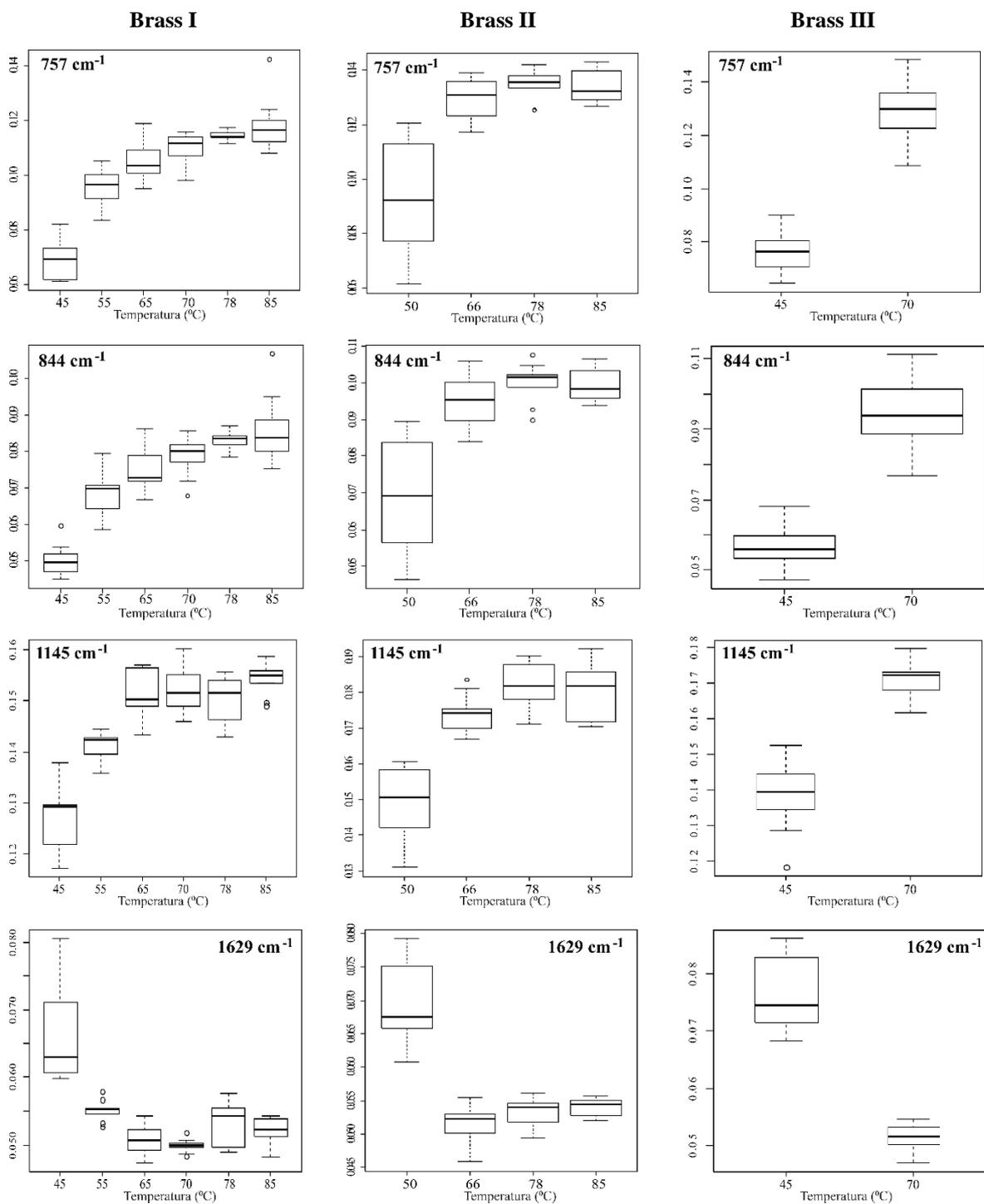
**Figura 2.23-** Gráfico da análise de componentes principais de cada rampa. **(a)** Brass I; **(b)** Brass II; **(c)** Brass III.

**Tabela 2.4-** Valores de F e p para cada pico selecionado no espectro de absorção para as diferentes brassagens. Em negrito tem-se valores mais significativos.

PICOS (CM <sup>-1</sup> )	Brass I		Brass II		Brass III	
	F	p	F	P	F	p
757	<b>72,2518</b>	<b>&lt; 2e-16</b>	<b>28,2538</b>	<b>2,367e-09</b>	<b>395,2543</b>	<b>&lt; 2,2e-16</b>
844	<b>44,1253</b>	<b>4,689e-16</b>	<b>24,1064</b>	<b>1,519e-08</b>	<b>238,181</b>	<b>2,752e-14</b>
923	25,4704	5,659e-12	<b>19,7781</b>	<b>1,349e-07</b>	<b>136,7688</b>	<b>1,245e-11</b>
991	15,5234	8,618e-09	10,9491	3,496e-05	95,3749	5,159e-10
1022	2,0577	0,08901	5,0427	0,005356	0,1529	0,6991
1074	1,1069	0,3705	1,5252	0,2256	0,1092	0,7438
1103	13,7972	4,092e-08	19,8593	1,291e-07	35,2893	3,353e-06
1145	<b>46,4578</b>	<b>&lt;2e-16</b>	<b>40,0234</b>	<b>2,953e-11</b>	<b>192,3152</b>	<b>3,046e-13</b>
1230	8,5830	9,789e-06	8,6061	0,0002181	32,5275	6,118e-06
1259	8,0468	1,864e-05	8,8886	0,0001731	29,8989	1,116e-05
1361	15,3267	1,024e-08	18,5119	2,703e-07	73,1873	6,771e-09
1413	1,3240	0,2717	0,8113	0,4965	8,7353	0,006717
1629	<b>27,4105</b>	<b>1,729e-12</b>	<b>54,7627</b>	<b>4,167e-13</b>	<b>321,5197</b>	<b>8,736e-16</b>
2883	20,9151	1,208e-10	4,8271	0,006623	<b>121,0691</b>	<b>4,502e-11</b>
2927	<b>27,0744</b>	<b>2,114e-12</b>	8,2044	0,0003046	<b>134,5521</b>	<b>1,481e-11</b>
3315	20,4860	1,649e-10	4,8843	0,006259	37,4252	2,147e-0

Uma vez que os picos 757, 844, 923 e 1629 cm<sup>-1</sup> se mostraram significantes em todas as brassagens, utilizamos o método de modelo linear generalizado para observar o comportamento deles em cada rampa de temperatura de cada brassagem. Os gráficos são mostrados na Figura 2.24. O pico 757 cm<sup>-1</sup> referente à maltose, em **Brass I** cresce gradualmente até a rampa de 65°C, na **Brass II** até a rampa de 66°C, tendo uma grande variação entre as amostras da rampa de 50°C, e para **Brass III** ocorre um grande salto entre as duas temperaturas. Em todos os casos este pico representa em quais temperaturas a maltose teve suas maiores produções em cada brassagem. O pico 844 cm<sup>-1</sup> referente a Dextrina, na primeira brassagem (**Brass I**) tem um maior crescimento até a rampa de 55°C; para a **Brass II** esta cresce até a rampa de 66°C tendo o mesmo comportamento que o pico da maltose para esta brassagem, isso ocorre devido ao longo tempo de pausa nesta rampa que ativa as enzimas de produção tanto de maltose quanto de dextrina; e para **Brass III** ocorre o mesmo salto que para o pico anterior. O pico 1145 cm<sup>-1</sup> referente também a maltose, para a **Brass I** tem o mesmo comportamento que o pico 757 cm<sup>-1</sup>, indicando um crescimento até a rampa de 65°C; porem para **Brass II** difere-se do outro pico, pois seu crescimento ocorre até a rampa de 78°C sugerindo que até mesmo em fase de desnaturação as enzimas atuam para produção de maltose. Comparando com a **Brass I** podemos inferir que devido a utilização da rampa de 70°C ocorre uma desaceleração ou desnaturação parcial destas enzimas nesta rampa. Para **Brass III** ocorre o mesmo salto que os picos anteriores, devido a utilização de apenas duas rampas, que são distintas em relação as concentrações da produção de seus subprodutos. O último pico mostrado (1629

$\text{cm}^{-1}$ ) referente a dextrina, em todas as brassagem ocorre um decréscimo na fase inicial do processo, para Brass I o descaimento cessa na rampa de  $65^{\circ}\text{C}$ , para Brass II em  $66^{\circ}\text{C}$ , e para Brass III em  $70^{\circ}\text{C}$ , podendo indicar que este pico seja substituído pelos picos da maltose e por isso seu comportamento constante durante as demais etapas dos processos.



**Figura 2.24-** Comportamento de alguns picos nas brassagens de acordo com as rampas de temperatura utilizado.

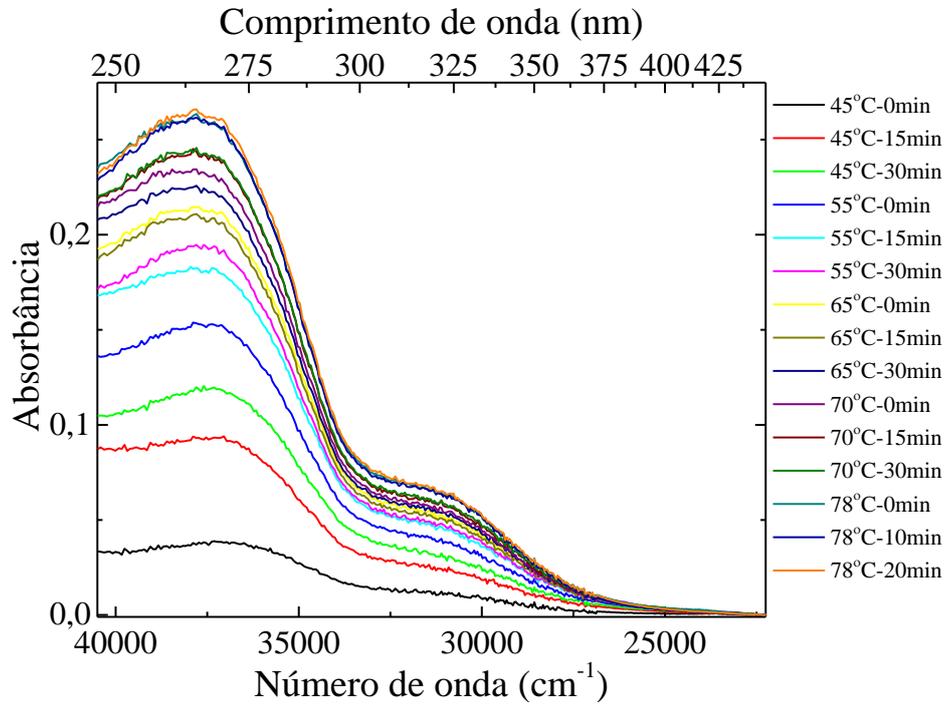
Na literatura são relatados vários trabalhos utilizando a técnica de FTIR-ATR para análise da cerveja (GARRIGUES & GUARDIA, 2009; POLSHIN et al., 2011). LLARIO et al. (2006) utilizou FTIR-ATR para analisar cervejas espanholas com diferentes composições, sendo algumas delas normal (que utiliza malte de cevada e adjuntos), 100% malte, sem álcool, cerveja com soda, entre outras. As principais diferenças encontradas neste estudo foi quando se comparou os espectros da cerveja sem álcool com as alcoólicas, ocorrendo diferenças em picos centrados em  $875\text{ cm}^{-1}$  (C-C-O estiramento dentro do plano),  $1052\text{ cm}^{-1}$  (C-C-O estiramento fora do plano),  $1800\text{ cm}^{-1}$  (C-C estiramento) e  $2970\text{ cm}^{-1}$  (banda de grupos metil estiramento assimétrico), as quais estão relacionadas à absorção do etanol. DUARTE et al. (2004) analisou diferentes tipos de cerveja (*Ale*, *Lager* e sem álcool) fabricadas por vários países (Alemanha, Bélgica, Portugal, Espanha, Holanda, Estados Unidos entre outros), sendo constatado diferenças entre as cervejas com um teor alcoólico maior, as quais ficaram evidentes os picos do etanol ( $879$ ,  $1045$ ,  $1085\text{ cm}^{-1}$ ), e também das que não continham álcool, que evidenciaram os picos da maltose e dextrina ( $998$ ,  $1078$ ,  $1110\text{ cm}^{-1}$ ). Todos os trabalhos apresentados evidenciam os picos dos carboidratos e do etanol em todos os tipos de cerveja.

Comparando a literatura com este presente trabalho, as diferenças estão somente na absorção do etanol no processo de brassagem, sendo que os picos dos açúcares, principalmente maltose e dextrina, também são encontrados no produto final. Podemos inferir que a técnica de FTIR-ATR tem boa sensibilidade para determinar as variações que ocorrem no processo de brassagem quanto aos açúcares presentes.

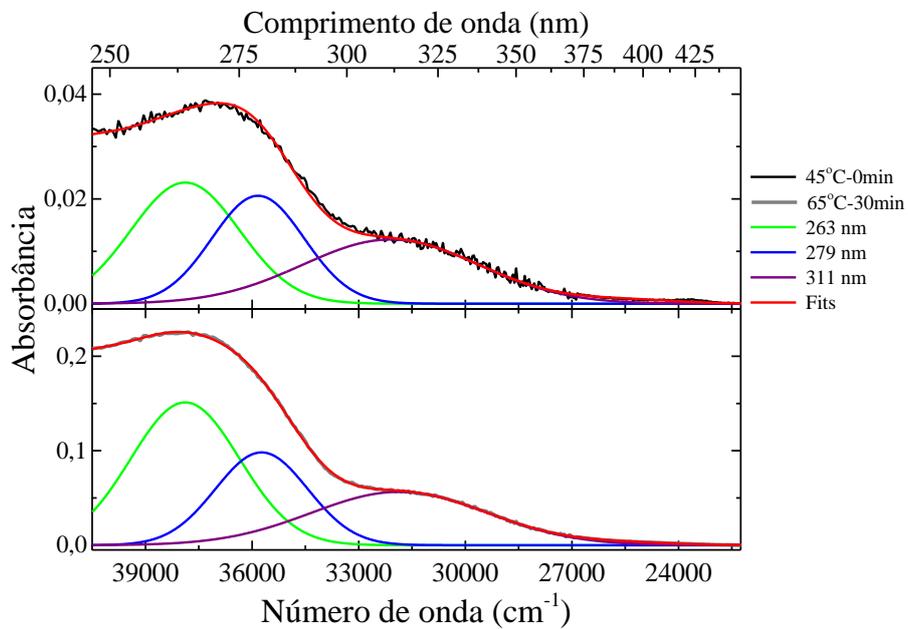
#### **2.4.2.2- Absorção molecular no Ultravioleta e Visível**

Foram realizados experimentos de absorção no ultravioleta e visível de todas as amostras coletadas nas três brassagens, os resultados referem-se as médias de cada amostra. Os espectros não revelaram absorção das amostras na faixa do visível (400 a 700 nm), por isso esta região foi omitida nos gráficos. A Figura 2.25 mostra os espectros coletados para **Brass I**, observa-se variações nas intensidades conforme o processo da brassagem ocorre, tendo aparentemente duas bandas de absorção, a primeira entre 250 e 300 nm bem intensa e a segunda entre 300 e 375 nm menos intensa. Para melhor analisar as variações nos espectros, utilizou-se a método de deconvolução por gaussianas. Três gaussianas foram o mínimo encontrado para realizar um bom ajuste nas curvas (Figura

2.25), sendo centralizadas em 263, 279 e 311 nm. Nesta região ocorre a absorção dos aminoácidos e da vitamina B (riboflavina).

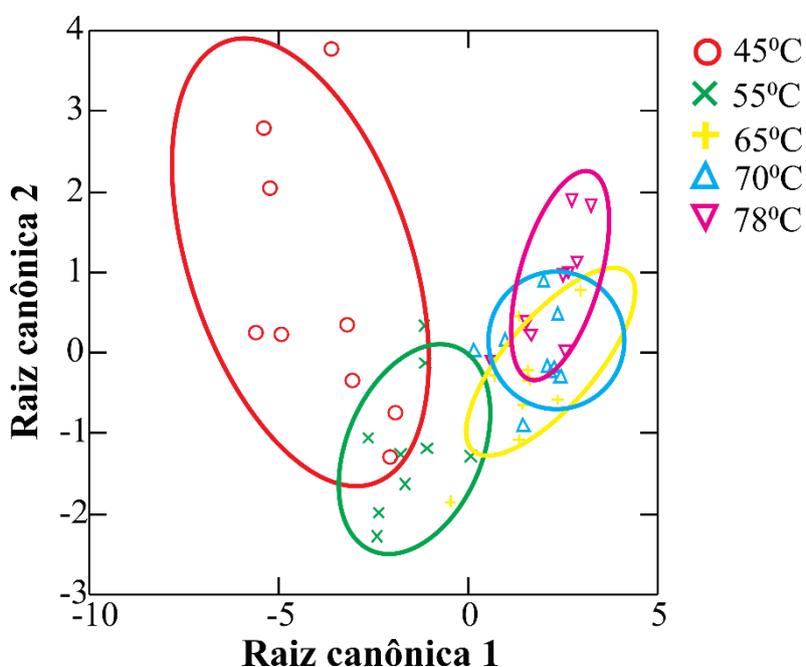


**Figura 2.25-** Absorção no UV-Vís das amostras coletadas durante Brass I.



**Figura 2.26-** Curvas geradas pela deconvolução dos espectros da absorção no UV-Vís para as amostras 45°C-0min e 65°C-0min, sendo iguais para as demais amostras.

As intensidades das gaussianas foram utilizadas na análise discriminante. A Figura 2.27 mostra o gráfico de dispersão em relação a temperatura para **Brass I**. A raiz canônica 1 explica 93% dos dados, tendo  $F= 13,04$  e  $p<0,000$ . As rampas de 45 e 55°C são as que mais se separam na raiz 1, sendo estatisticamente distintas pois comparado com os demais grupos de temperatura tiveram  $p<0,000$ . A rampa de 65°C não se distingue da rampa de 70°C ( $p= 0,646$ ), e a rampa de 70°C não é distinta de 78°C ( $p=0,276$ ). Nas primeiras rampas (45 e 55°C) ocorre a ativação da enzima protease que hidrolisam proteínas e aminoácidos. Os pontos mais afastados do grupo de temperatura 45°C, são as amostras de 45°C-0min e 45°C-15min, pois durante esta rampa está ocorrendo a gelatinização, sendo que no primeiro instante é solubilizado as substâncias livres que estão presentes no malte, e logo em seguida começa a atuação das enzimas.



**Figura 2.27-** Gráfico de dispersão gerado pela análise discriminante para **Brass I**.

A Figura 2.28 mostra os espectros para **Brass II e II**, que são semelhantes ao encontrado em **Brass I**. Os mesmos picos encontrados para a primeira brassagem foram identificados para as demais. Utilizando as intensidades dos picos e fazendo análise discriminante, para **Brass II** obtivemos o gráfico de dispersão apresentado na Figura 2.29, o qual explica 87% dos dados somente pela raiz 1, com  $F=12,06$  e  $p<0,000$ . Nesta brassagem também fica evidente a distinção da rampa de 50°C comparada com as demais com  $p<0,000$ , sendo a rampa de 66°C estatisticamente semelhante a 78°C ( $p=0,410$ ). Para

esta brassagem a única rampa que ativa as enzimas que geram os aminoácidos e proteínas é de 50°C. Para **Brass III** os dois grupos de temperaturas são distintos, e pela análise discriminante explica 91% dos dados, com  $F=46,80$  e  $p<0,000$ .

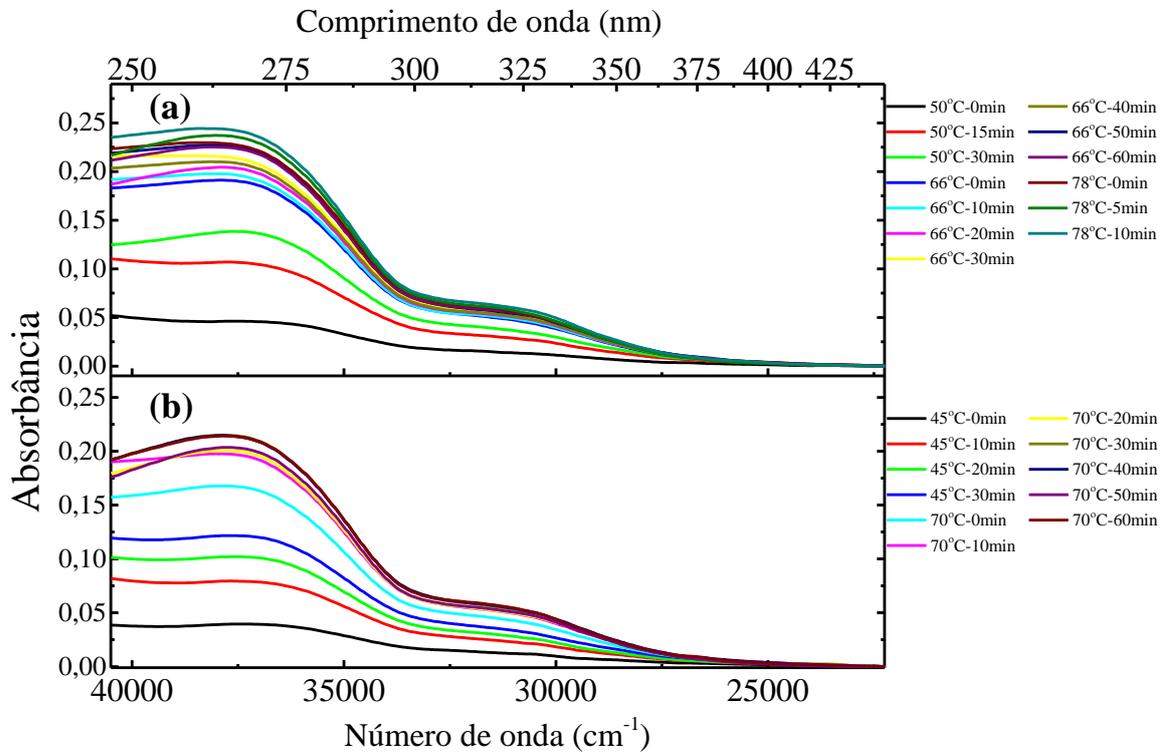


Figura 2.28- Absorção no UV-Vís das amostras coletadas durante (a) Brass II; (b) Brass III.

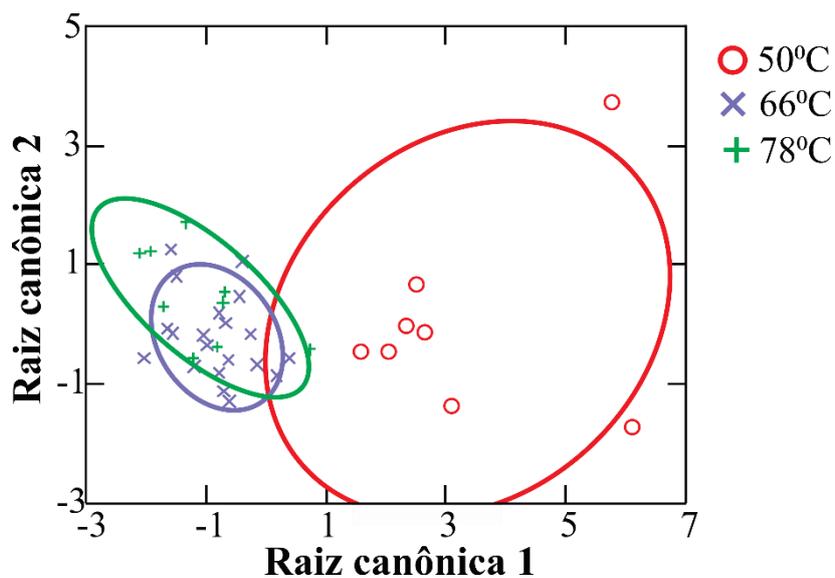


Figura 2.29- Gráfico de dispersão gerado pela análise discriminante para Brass II.

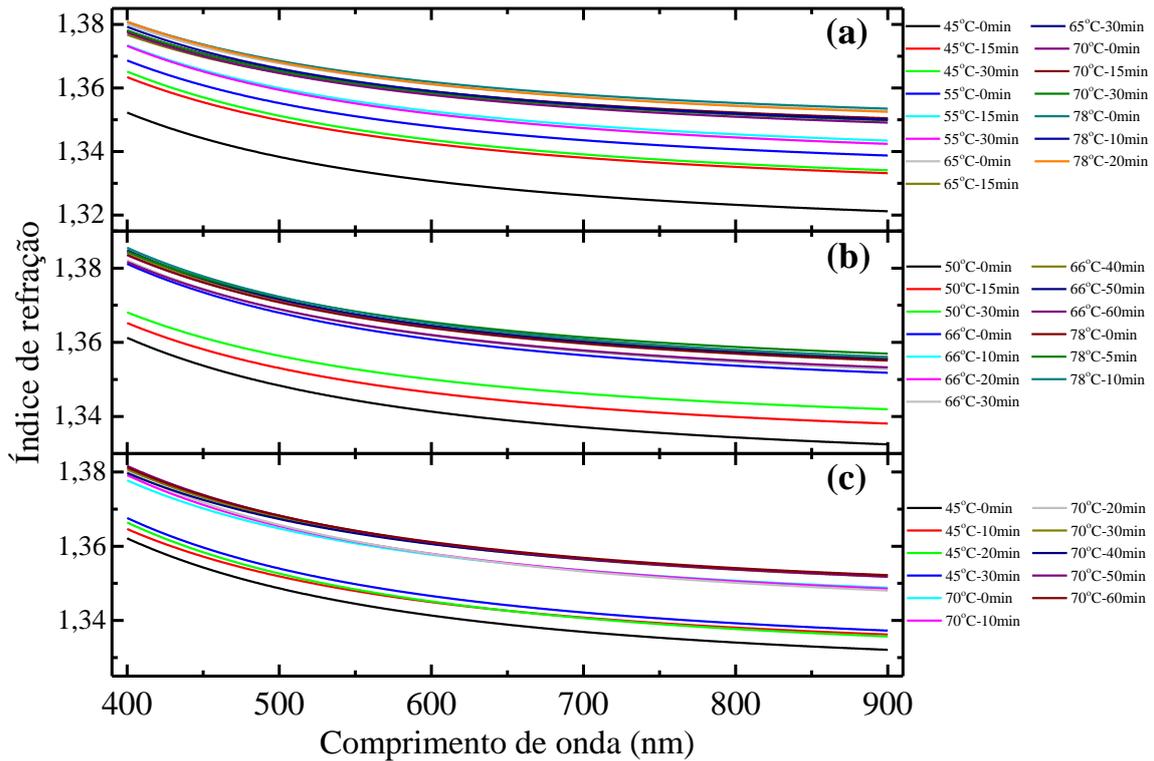
Os gráficos de dispersão mostram que em todas as brassagem ocorre a distinção das rampas que ativa as enzimas protease (endo- e exopeptidase), que geram principalmente os aminoácidos. Para **Brass I** ocorre nas rampas de temperatura 45 e 55°C, e para **Brass II** na rampa de 50°C. Devemos destacar que a pouca distinção das demais rampas em ambos os processos se deve ao fato das enzimas protease não ser resistente a altas temperaturas, tendo seu limite de ação de 60°C (STEWART, 2009). As proteínas e aminoácidos são fundamentais para o processo de fabricação, pois geram os nutrientes necessários para as leveduras, e é essencial para a formação de espuma.

TAN et al. (2015) analisou a absorção no UV-Vis de cervejas tipo Lager com diferentes características, e os espectros obtidos foram similares aos apresentados neste trabalho. A absorção apresentada é típica de componentes como iso- $\alpha$ -ácidos, grupos da vitamina B, aminoácidos e compostos fenólicos (CHRISTENSEN et al., 2005). Os  $\alpha$ -ácidos está relacionado ao amargo da cerveja, este composto é utilizado para diferenciar os tipos de cerveja pela porcentagem de iso- $\alpha$ -ácidos, sendo encontrado principalmente no lúpulo (ALCÁZAR & JURADO, 2012). Os aminoácidos e compostos fenólicos, principalmente os polifenóis, são responsáveis pelas características organolépticas e pela estabilidade, sendo provenientes da malteação e principalmente do tipo de brassagem (ARON & SHELLHAMMER, 2010; GORINSTEIN, et al. 1999). Dentre o grupo de vitamina B, o componente mais importante é a vitamina B<sub>2</sub> (riboflavina) que atribui à cerveja os componentes necessários para uma boa nutrição (De GAETANO et al., 2016). Dentre todos estes componentes, os que mais estão influenciando na absorção durante a brassagem são os aminoácidos, polifenóis e vitamina B. Apesar de compostos diferentes absorverem na mesma região do ultravioleta, tanto componentes gerados durante o processo de brassagem quanto os gerados pelas demais etapas até o produto final, foi constatado que os aminoácidos é o principal elemento para o monitoramento das brassagens.

#### **2.4.2.3- Índice de refração espectral**

O índice de refração é uma medida sensível aos componentes presentes nas amostras estudadas. As medidas dos índices de refração das amostras coletadas durante as brassagem foram feitas pelo interferômetro de Michelson com fonte de luz branca, que permite obter o índice de refração espectral no espectro visível-infravermelho próximo (400-900 nm) (ROCHA et al., 2016). A Figura 2.30(a) mostra as curvas dos índices de

refração para as amostras da primeira brassagem (**Brass I**). As curvas da rampa de temperatura de 45°C apresentam índices de refração menores, entretanto, com o tempo de tratamento térmico, o índice apresenta um comportamento crescente, o qual acompanha a temperatura e o tempo, sendo crescente até o início da rampa de 65°C (65°C-0min), tendo pouca variação a partir desta rampa até o início de 78°C, que volta a um índice de refração mais elevado.



**Figura 2.30-** Curvas do índice de refração de cada amostra coletadas em Brass I (a), Brass II (b), e Brass III (c).

A Figura 2.30(b) apresenta as curvas do índice de refração para as amostras da segunda brassagem (**Brass II**), sendo crescente as curvas da primeira rampa de temperatura (55°C). A curva da primeira amostra de 66°C (66°C-0min) apresenta-se mais elevada que as da rampa anterior, a partir desta amostra as curvas tem pouco variação. A Figura 2.29(c) apresenta as curvas para as amostras da terceira brassagem (**Brass III**), esta apresenta uma distinção clara entre as rampas de temperatura, tendo as amostras da primeira rampa (45°C) menores índices de refração, ocorrendo um salto entre as rampas.

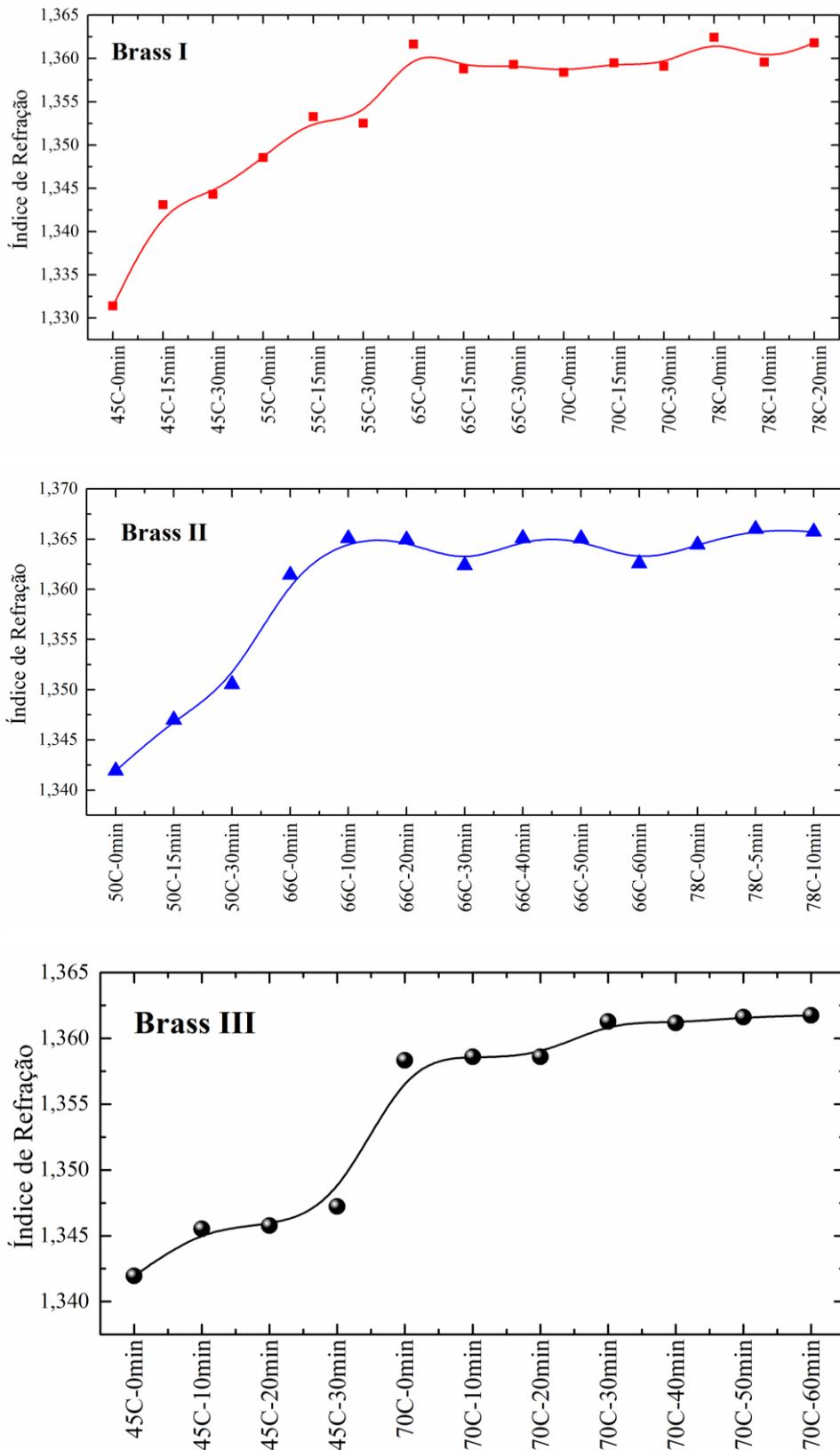
A cerveja pronta tem índice de refração de aproximadamente 1,345 (APPLICATIONS NOTE, 1995), comparado com o processo de brassagem este índice é menor, pois após o processo de fermentação ocorre o consumo dos açúcares que são os

principais componentes na etapa de brassagem e que são os responsáveis pela elevação do índice de refração. A Tabela 2.5 mostra os índices de refração de alguns compostos encontrados na etapa de brassagem, sendo açúcares e aminoácidos. Comparado com os índices encontrados nas amostras das brassagens, pode-se inferir que os aminoácidos produzidos não interferem ativamente no índice de refração

**Tabela 2.5-** Índice de refração de alguns compostos que estão presentes no processo de brassagem da cerveja.

<b>Compostos</b>	<b>Índice de Refração a 25°C</b>	<b>Referência</b>
Maltose	1,337-1,448	McDONALD (1951)
Frutose	1,463- 1,480	HOBBS (2009)
Glicose	1,335- 1,411	TAN & HUANG (2015)
Fenilalanina	1,682	McMEEKIN et al. (1964)
Tirosina	1,754	McMEEKIN et al. (1964)

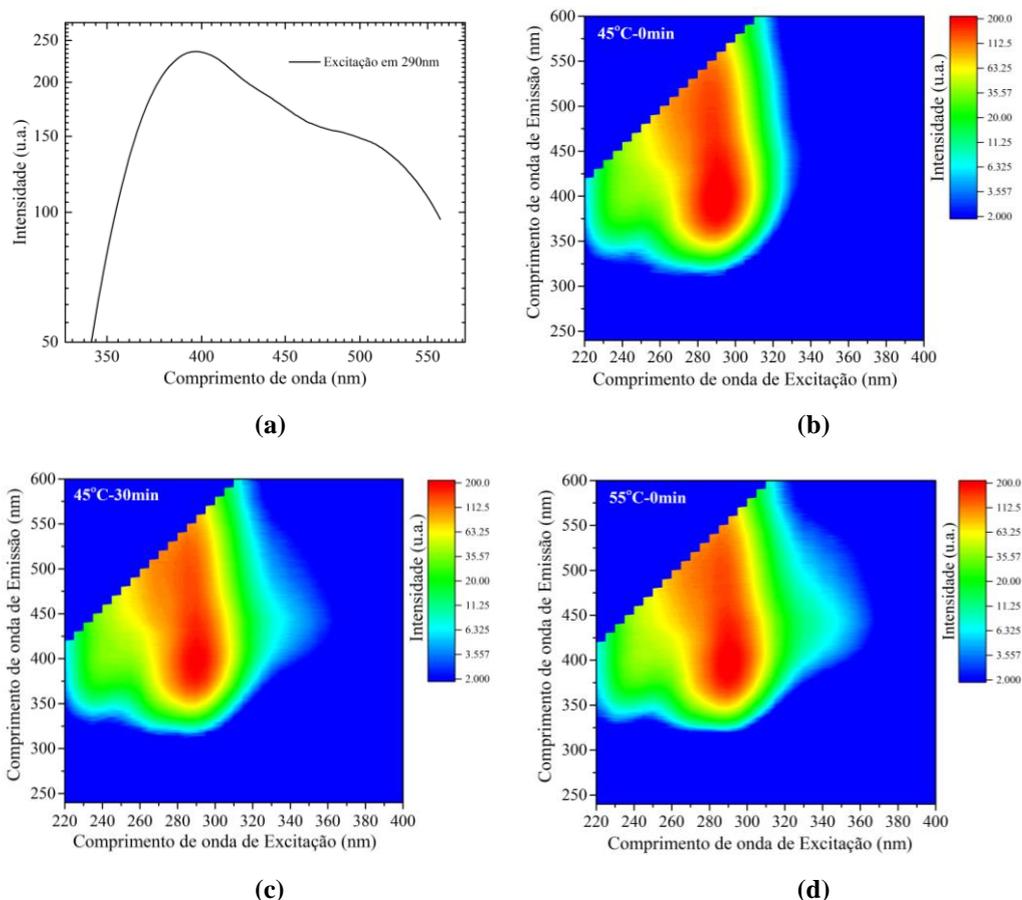
O índice de refração é utilizado para medir o aumento dos açúcares durante a brassagem pela medida do °Brix, que geralmente é gerado por um refratômetro, como apresentado na seção 2.4.1. Para estes aparelhos o comprimento de onda utilizado é 589 nm. Para comparar com estas medidas, a Figura 2.30 mostra a variação do índice de refração das três brassagens para um único comprimento de onda de 589 nm retirado dos dados de índice de refração espectral, e observamos que os comportamentos das curvas destes gráficos estão de acordo com o comportamento visto nos gráficos da medida de °Brix (ver Figuras 2.16(d); 2.17(d); 2.18(d)). As pequenas variações no índice de refração podem ter sido geradas, pelas amostras que contém índices mais elevados de dextrina, a presença de quantidades elevadas desse açúcar distorce o índice de refração (ESSERY, 1954). Os cervejeiros caseiros utilizam somente a leitura do °Brix ao final da brassagem para utilizar como parâmetro para o cálculo da quantidade de açúcar fermentável, porem se produzir uma cerveja com uma concentração elevada de dextrina, então terá um valor errado de °Brix.



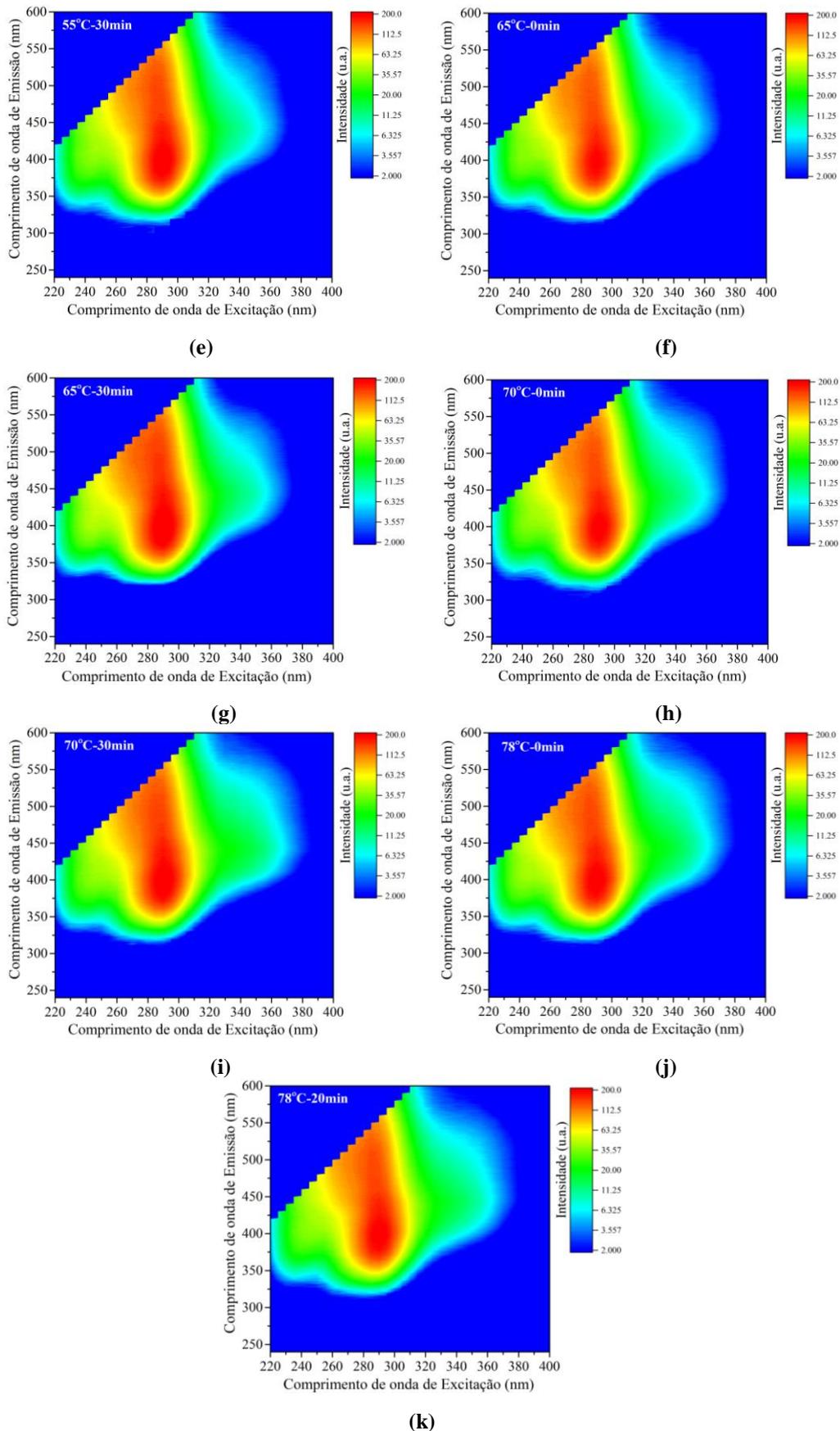
**Figura 2.31-** Índice de Refração para o comprimento de onda e 589nm retirado dos dados de índice de refração espectral para comparação com os dados de °Brix.

#### 2.4.2.4- Fluorescência de excitação e emissão óptica

Os componentes da cerveja dependem das condições de fabricação e das matérias-primas utilizadas. Em geral, existem somente três grupos que são fluorescentes na cerveja, aminoácidos, vitaminas e polifenóis. A Figura 2.32 apresenta os mapas de contorno das amostras iniciais e finais de cada rampa de temperatura obtidas pelo processo da primeira brassagem (**Brass I**), as quais foram excitadas de 220 a 400 nm, observando as emissões entre 240 e 600 nm.



**Figura 2.32-** (a) Luminescência da amostra de 45°C-0min excitada em 290nm. (b)-(d) Mapas de excitação e emissão das amostras coletadas durante a primeira Brassagem (**Brass I**)



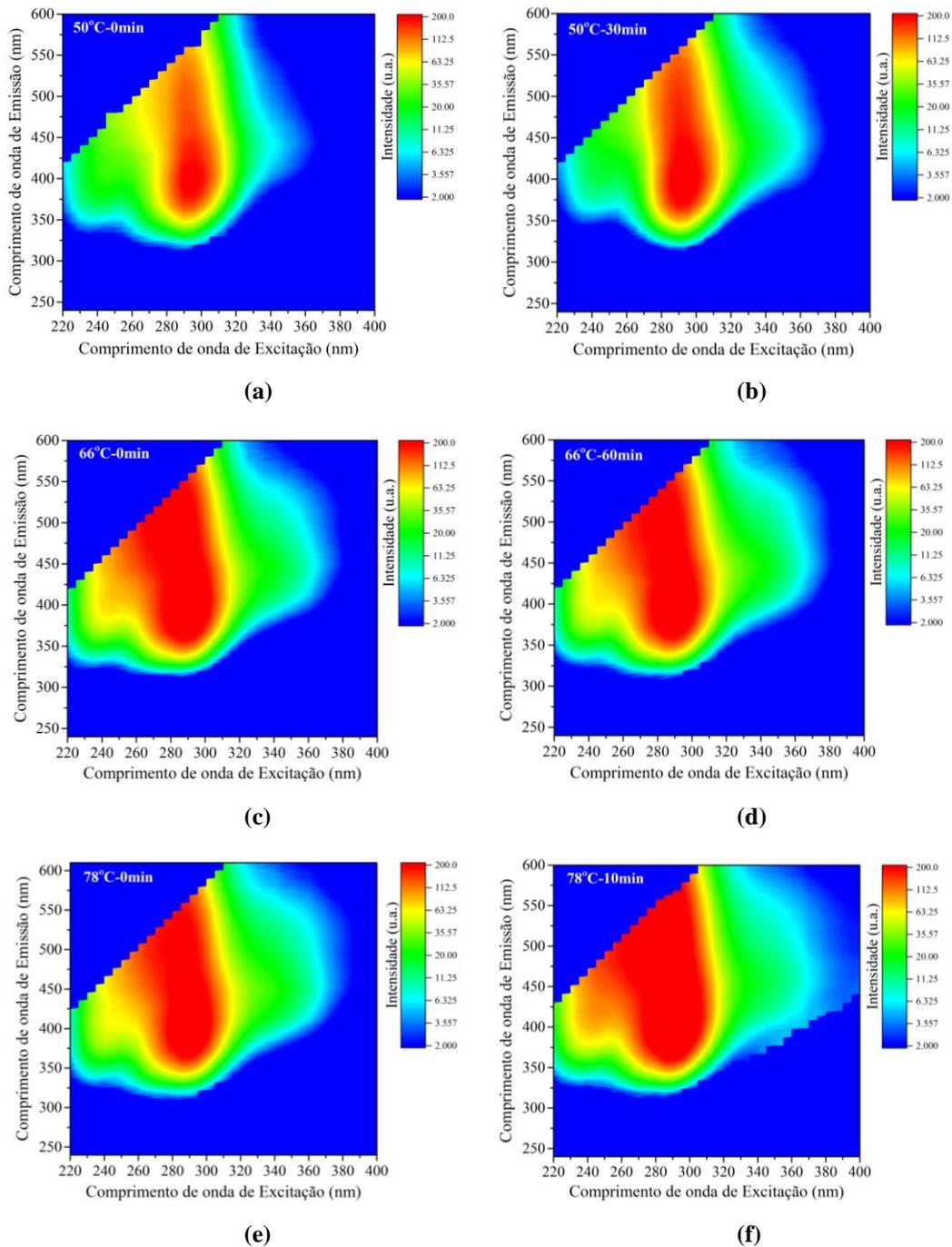
**Figura 2.32- Continuação (e)-(k) Mapas de excitação e emissão das amostras coletadas durante a primeira Brassagem (Brass I)**

No início do processo (amostra 45°C-0min) observa-se quatro regiões de excitação/emissão distintas, sendo a primeira excitando entre 220 e 245 nm tem-se emissão entre 340 e 470 nm, tendo uma intensidade baixa. A segunda ocorre excitando entre 255 e 265 nm e emissão 425 e 500 nm, mais intensa que a primeira. A terceira, sendo a de maior intensidade, aparece quando se excita entre 260 e 310 nm com emissão localizada entre 345 e 570 nm. Por último observa-se, excitando entre 310 e 320 nm a amostra emite entre 360 e 600 nm. O componente que apresenta maior fluorescência são os aminoácidos, sendo que somente os aminoácidos aromáticos são fluorescentes, os principais são: triptofano (excitação/emissão em aprox. 280/355 nm), tirosina (275/300 nm) e fenilalanina (260/280 nm) (SIKORSKA et al., 2004; SIKORSKA et al., 2008). Estes compostos fluorecem na mesma região, porém com excitação acima de 295 nm somente o triptofano exibe fluorescência (SIKORSKA et al., 2004). Nesta amostra há também a fluorescência da vitamina B<sub>3</sub> (niancin), sendo este composto por ácido nicotínico, nicotinamida, e suas formas de coenzimas (nicotinamida adenina dinucleotídeo e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), que tem fluorescência excitando em 260 e 340 nm e emissão em torno de 470 nm. A cerveja é rica em vitamina B, tipicamente B1 (0,003-0,006 mg/100 g), B2 (0,02-0,04 mg/100 g), B3 (0,65-1,1 mg/100 g), e B6 (0,03–0,08 mg/100 g) (SIKORSKA et al., 2004).

As demais amostras apresentaram os mesmos padrões de excitação e emissão visto em 45°C-0min, com um acréscimo de uma banda excitando em torno de 330 nm com emissão após 400 nm, sendo que ao término da primeira rampa de temperatura (45°C-30min) a fluorescência é mínima. As amostras seguintes apresentam fluorescência mais intensa, crescendo gradativamente até o final da rampa de temperatura de 70°C (70°C-30min), ficando estável na última rampa de temperatura (78°C). Esta região é caracterizada pela fluorescência dos polifenóis, tendo emissão em torno de 430 nm com excitação em 340 nm, estes compostos mesmo em pequenas quantidades exibem fluorescência intensa (CHRISTENSEN et al., 2005).

A Figura 2.33 apresenta os mapas de contorno obtidos com a segunda brassagem (**Brass II**). No início da primeira rampa de temperatura (50°C-0min) aparecem as bandas dos aminoácidos (ex. 275-315 nm/em. 435-500 nm), da vitamina B<sub>3</sub> (ex. 315-330 nm/em. 345-600 nm) e também as dos polifenóis (ex. 330-340 nm/em. 400-500 nm). A fluorescência dos polifenóis cresce gradativamente até o final da rampa de 66°C, permanecendo estável durante a última rampa (78°C). Além dessas bandas, no início da

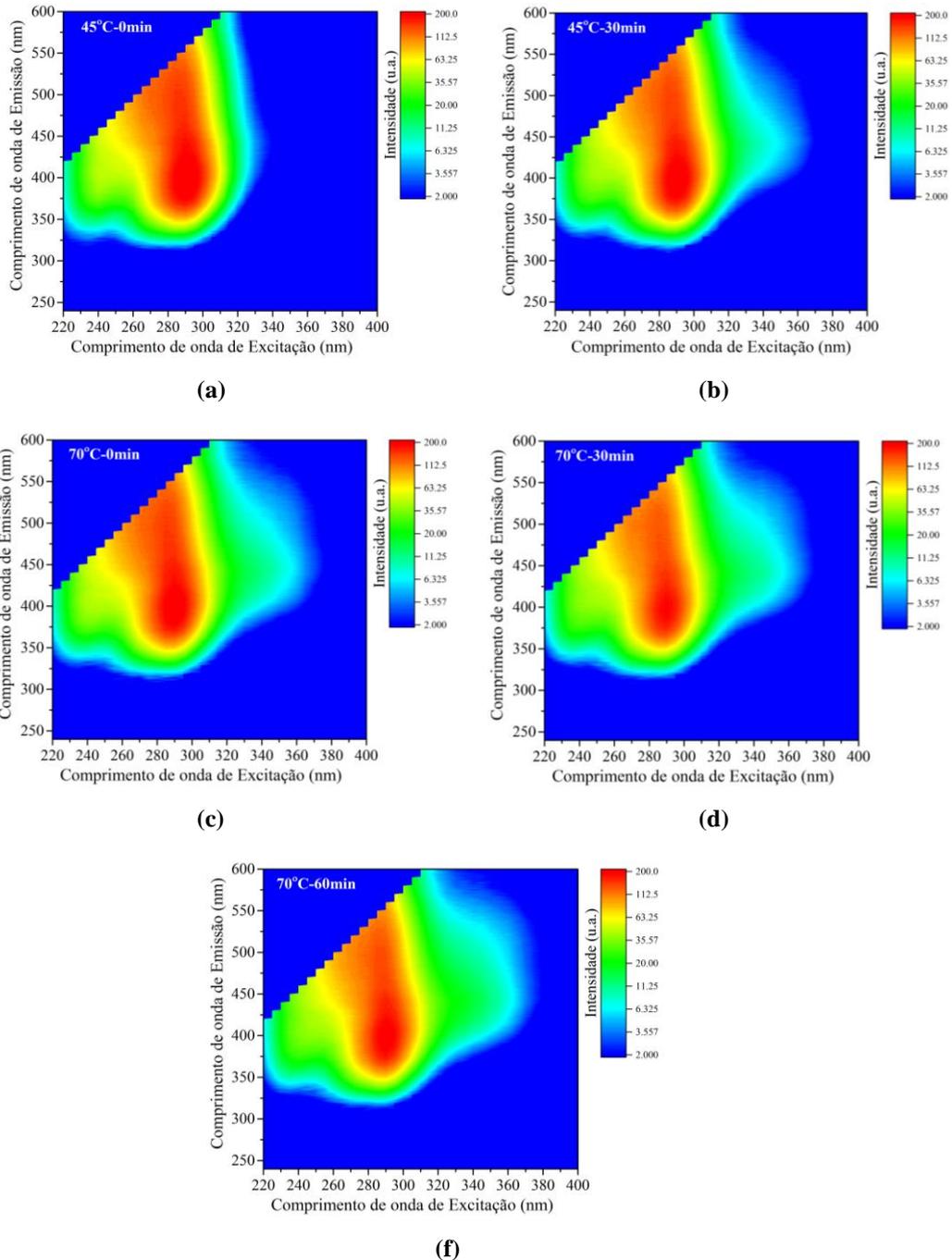
rampa de 66 °C aparece uma banda com excitação entre 235 e 255 nm e emissão entre 385 e 450 nm.



**Figura 2.33-** Mapas de excitação e emissão das amostras coletadas durante a segunda Brassagem (Brass II).

A Figura 2.34 apresenta os mapas de contorno das amostras coletadas durante a terceira brassagem (**Brass III**). No início da brassagem (45°C-0min) observa-se bandas de fluorescência dos aminoácidos (ex. 260-310 nm/em. 425-550 nm) e da vitamina B<sub>3</sub>

(ex. 310-320 nm/em. 360-600 nm), sendo que somente ao termino desta rampa começa a aparecer a fluorescência dos polifenóis (ex. 325-350 nm/em. 380-530 nm), que se intensifica até o final da rampa de 70°C.



**Figura 2.34-** Mapas de excitação e emissão das amostras coletadas durante a terceira Brassagem (Brass III)

Comparando as três brassagens observa-se que existe diferenças na **Brass II** com as demais. Primeiramente, na primeira rampa de temperatura (50 °C) já se observa a

fluorescência dos polifenóis, o que não é observado nas demais brassagens, isso pode ocorrer pelo fato da temperatura inicial desta brassagem ser maior, assim favorecendo a solubilização deste composto que já está presente no malte. A segunda banda que aparece na **Brass II** e não aparece nas outras brassagens, é excitando em torno de 240 nm com emissão em entre 385 e 450 nm que aparece início da rampa de 66 °C.

A cerveja é uma mistura complexa com elementos fluorescente e não-fluorescentes, dentre os fluorescentes estão os aminoácidos, grupo de vitaminas B e polifenóis, e dentre o não-fluorescentes encontra-se os açúcares (maltose, frutose, dextrina, etc.). Devido a esta complexidade, interações intermoleculares entre os compostos envolvendo transferência de energia ou colisões que geram auto extinções são suscetíveis de ocorrer, sendo assim pode haver distorções nos padrões de fluorescência, tendo sobreposição de compostos que emitem na mesma região (APPERSON et al., 2002; SIKORSKA et al., 2003). Por isso, é difícil a caracterização completa da cerveja, tanto em seu processo de fabricação quanto no produto final.

Vários estudos já foram feitos utilizando a técnica de excitação e emissão para analisar cervejas. INSÍNSKA-RAK et al. (2007) estudou as diferenças causadas nos compostos fluorescentes devido ao processo de envelhecimento térmico forçado da cerveja, observando as bandas de emissão em 250-350 nm e 400-550 nm, correspondentes aos aminoácidos e ao grupo de vitamina B, respectivamente. SIKORSKA et al. (2004) analisou a discriminação entre os principais tipos de cervejas (lager e ale) de diferentes cervejarias, concluindo que as variações mais relevantes ocorrem nos grupos de aminoácidos e vitamina B. SIKORSKA et al. (2006) monitorou a fluorescência de amostras de cerveja durante diferentes tipos de estocagem (com e sem incidência de luz), neste processo observaram que o composto que distingue esses tipos de estocagem foi a riboflavina (vitamina B2). Estes trabalhos utilizam excitação entre 250 e 550 nm com emissão entre 290 e 700 nm, comparado com o apresentado, é observado emissões relevantes quando se excita a amostra abaixo de 250 nm, e não se tem emissões acima de 600 nm. Desta forma, o processo de brassagem apresenta componentes fluorescentes que são consumidos nos demais processos, pois não mais parecerem no produto final. Entretanto, a análise dos principais componentes fluorescentes -aminoácidos, grupo de vitamina B e polifenóis- serve para caracterizar diferentes tipos de brassagens, diferenciando a composição de cada uma.

## 2.5- Conclusão

As técnicas comumente utilizadas para analisar o mosto final da etapa de brassagem foram aplicadas no monitoramento deste processo, sendo estas: teste de sacarificação do iodo, medidas de °Brix e cromatografia líquida de alta eficiência. O teste de sacarificação do iodo utilizado para monitorar os processos em tempo real revelou que a coloração da mistura iodo+amostra muda quando a enzima  $\alpha$ -amilase começa a atuar no mosto, esta enzima quebra o amido transformando em dextrina, e com essa atuação a quantidade de amido decresce rapidamente não sendo mais detectado pelo teste. Porém este teste não indica que a etapa de sacarificação terminou, pois ainda se tem açúcares sendo gerado. A medida do °Brix indica relação da quantidade de açúcares presentes no mosto, sendo que para a primeira e segunda brassagem tiveram aproximadamente 15,0 °Brix indicando que são ideais para o processo de fabricação de cerveja do tipo Pilsen, já para a terceira brassagem obteve-se 14,3 que seria ideal para cervejas belgas, como era o objetivo desta brassagem. As medidas de °Brix são importantes pois são utilizadas para os cálculos da etapa de fermentação, e são comumente utilizadas após a filtração do mosto. Fazendo o acompanhamento do processo de brassagem por estas medidas se pode obter melhor o controle da brassagem, e saber exatamente qual tempo é ideal para atingir o nível de açúcar desejado, porém esta medida inclui qualquer tipo de açúcar, e não especificamente a maltose, que é o principal composto do mosto. A cromatografia líquida de alta eficiência identificou quatro açúcares principais no processo de brassagem: maltose, dextrina, glicose e frutose. A maltose e a dextrina apresentaram maiores concentrações nas três brassagens, ao término da primeira brassagem as concentrações foram 75,40 gL<sup>-1</sup> e 42,60 gL<sup>-1</sup>, respectivamente. Na segunda brassagem foram 62,84 gL<sup>-1</sup> para maltose e 34,64 gL<sup>-1</sup> para dextrina, e para a terceira 60,14 gL<sup>-1</sup> para maltose e 37,15 gL<sup>-1</sup> para dextrina. As concentrações de glicose e frutose foram baixas em todas as brassagens, estes compostos devem apresentar baixas quantidades para não influenciar de forma negativa na etapa de fermentação.

As diferentes técnicas espectroscópicas aplicadas as brassagens podem ser utilizadas para o monitoramento e caracterização de forma eficiente deste processo. A absorção no infravermelho médio mostrou-se eficiente na caracterização dos açúcares presentes no mosto. Aplicando a análise de componentes principais utilizando os principais picos para a diferenciação, foi possível distinguir as rampas de temperaturas e observar a influência dos açúcares em cada uma de acordo com as enzimas atuantes. As

análises revelaram principalmente os picos da maltose e dextrina, com os quais foi possível a diferenciação dos espectros durante os processos.

A absorção no ultravioleta-visível apresentou as bandas de absorção dos aminoácidos e da vitamina B2. Pela técnica de deconvolução foram identificadas três bandas centradas em 263, 279 e 311 nm, sendo utilizadas para a análise estatística discriminante. A estatística revelou a distinção das primeiras rampas de temperatura das demais em todas as brassagens, sendo para a primeira brassagem a de 45 e 55°C, para a segunda de 50°C. Desta forma, evidenciam a ação da enzima protease, sendo ativadas nas primeiras rampas de temperatura, esta enzima produz aminoácidos que é um dos alimentos das leveduras.

A técnica do índice de refração espectral mostrou que para a primeira brassagem as curvas foram crescentes acompanhando cada rampa de temperatura utilizada. Para segunda brassagem observa-se a distinção entre a primeira rampa e as demais, o mesmo ocorre para a terceira brassagem. Com esta técnica é possível ver o comportamento da brassagem de acordo com o índice de refração nos comprimentos de onda de 400 a 900 nm. Comparando com as medidas de °Brix, o comportamento do índice de refração em 589 nm mostrou-se similar aos da medida com o refratômetro.

A técnica de fluorescência de excitação e emissão revelou o comportamento dos compostos aminoácidos, vitamina B e polifenóis presentes nos diferentes processos. Os aminoácidos (ex. 260-310 nm/ em. 345-570 nm) estão presentes durante todo o processo de brassagem, e são os que mais fluorescem. Os polifenóis (ex. 330 nm/em. 400 nm) aparecem na primeira e na terceira brassagem somente ao final da primeira rampa de temperatura (45°C), e na segunda já no início da primeira rampa (55°C), sendo o controle deste composto essencial para as características organolépticas da cerveja, brassagens que geram quantidades excessivas de polifenóis deixam o produto final adstringente, dando uma sensação de secura na boca ao degustar. Para tanto, com a técnica de fluorescência é possível monitorar estes compostos durante a brassagem.

## 2.6- Referências Bibliográficas

ALCÁZAR, Á.; JURADO, J.M. Differentiation of blonde beers according to chemical quality indicators by means of pattern recognition techniques. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 795-799, 2012.

ANDRES-LACUEVA, C.; MATTIVI, F.; TONO, D. Determination of riboflavin, flavin mononucleotide and flavin– adenine dinucleotide in wine and other beverages by highperformance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal Chromatography A**. v. 823, p. 355, 1998.

ANDRIOTTI, J.L.S. **Análise de componentes principais: fundamentos de uma técnica de análise de dados multivariada aplicável a dados geológicos**. Disponível em: < [http://www.cprm.gov.br/publique/media/Art\\_analise\\_componentes\\_Andriotti.pdf](http://www.cprm.gov.br/publique/media/Art_analise_componentes_Andriotti.pdf) >. Acesso em: 20 jan. 2017.

APPERSON, K.; LEIPER, K.A.; MCKEOWN, I.P.; BIRCH, D.J.S. Beer fluorescence and the isolation, characterization and silica adsorption of haze-active beer proteins. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 108, n. 2, p. 193-199, 2002.

APPLICATIONS NOTE. **Beer contamination**. 1995. Disponível em: < <http://www.indexinstruments.com/media/1720/beer-contamination-chart.pdf> >. Acesso em: 10 jan. 2017

AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial**. Edgard Blücher, 2001.

ARON, P.M.; SHELLHAMMER, T.H. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, p. 369-380, 2010.

BALL, D.W. Concentration Scales for Sugar Solutions. **Journal of Chemical Education**, v. 83, p. 1489-1491, 2006.

BANFORTH, C. **Beer: Tap into the Art and Science of Brewing**. 2 ed. Oxford University Press 2003. 233p.

- BANFORTH, C.W. **Beer: health and nutrition**. Blackwell Science Ltd. 2004. 184p.
- BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa- MG. UFV, 2008. p.13-24.
- BARKER, H. R.; BARKER, M. B. **Multivariate analysis of variance (MANOVA): a practical guide to its use in scientific decision-making**. University of Alabama Press, 1984. p. 129.
- BARTH, R. **The chemistry of beer: the science of suds**. John Wiley & Sons, 2013
- BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing yeast & fermentation**. Oxford, London: Blackwell Science, 2001. p. 644.
- BRANDAM, C.; MEYER, X.M.; PROTH, J.; STREHAIANO, P.; PINGAUD H. An original kinetic model for the enzymatic hydrolysis of starch during mashing. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, p. 43-52, 2003.
- BRIGGS, D.E.; BOULTON, C.A.; BROOKES, P.A.; STEVENS, R. **Brewing science and practice**. Woodhead Publishing Limited and CRC Press, 2004.
- BUCKEE, G.K.; MUNDY, A.P. Determination of ethanol in beer by gas chromatography (direct injection)—collaborative trial. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 99, p. 381-384, 1993.
- CARVALHO, D. S. Aceleração do processo fermentativo na obtenção de chope tipo *Pilsen*. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Pelotas, 2005.
- CARVALHO, G.B.M.; BENTO C.V.; SILVA, J.B.A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1º parte - as leveduras. **Revista Analytica**, v. 25, p. 36-42, 2006.
- CERVESIA. **Cerveja e Saúde**. 2013. Disponível em: < <http://www.cervesia.com.br/> >. Acesso em: 20 jan. 2017.

CHARLES, P. Beer Styles: Their Origins and Classification. p. 39-75. In: Fergus G. Priest; Graham G. Stewart. **Handbook of Brewing**. 2 ed. Taylor & Francis Group, LLC. 2006. 829p.

CHRISTENSEN, J.; LADEFOGED, A.M.; NØRGAARD, L. Rapid Determination of Bitterness in Beer Using Fluorescence Spectroscopy and Chemometrics. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, p. 3-10, 2005.

CLARK, J.C.; BURROUGHS, L.J.; GUZINSKI, J.A. High-Performance Liquid Chromatography Analysis of Tetrahydro-iso-alpha-acids in Beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 56, p. 76, 1998.

COLTHUP, N. B.; DALY, L. H.; WIBERLEY, S. E. **Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy**. 3. ed. Academic Press, 1990. 74 p.

COUTINHO, C.A.T.; SILVA, C.A.; PANZANI, M.M. **História da cerveja**. 2012. Disponível em: < <http://www.cervesia.com.br/historia-da-cerveja/410-a-cerveja-e-sua-historia.html> >. Acessado em: 20 jan. 2017.

De GAETANO, G.; COSTANZO, S.; DI CASTELNUOVO, A.; BADIMON, L.; BEJKO, D.; ALKERWI, A'A.; CHIVA-BLANCH, G.; ESTRUCH, R.; LA VECCHIA, C.; PANICO, S.; POUNIS, G.; SOFI, F.; STRANGES, S.; TREVISAN, M.; URSINI, F.; CERLETTI, C.; DONATI, M.B.; IACOVIELLO, L. Effects of moderate beer consumption on health and disease: A consensus document. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 26, p. 443–467, 2016.

De KEUKELEIRE, D.; VINDEVOGLE, J.; SZUCS, R.; SANDRA, P. The history and analytical chemistry of beer bitter acids. **Trends in analytical chemistry**. v. 11, p. 275-280, 1992.

de PACUAL-TERESA, S.; TREUTTER, D.; RIVAS-GONZALO, J.C.; SANTOS-BUELGA, C. Analysis of Flavanols in Beverages by High-Performance Liquid Chromatography with Chemical Reaction Detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4209-4213, 1998.

DONGARE, M.L.; BUCHADE, P.B.; SHALIGRAM, A.D. Refractive index based optical Brix measurement technique with equilateral angle prism for sugar and Allied Industries. **Optik**, v. 126, p. 2383-2385, 2015.

DRAGONE, G. Estudos Cinético do processo fermentativo de produção de cervejas em mostos concentrados. *Dissertação de Mestrado*. Faculdade de Engenharia em Química de Lorena, 2002.

DUARTE, I.F.; BARROS, A.; ALMEIDA, C.; SPRAUL, M.; GIL, A.M.; Multivariate Analysis of NMR and FTIR Data as a Potential Tool for the Quality Control of Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1031-1038, 2004.

DURAND, G.A.; CORAZZA, M.L.; BLANCO, A.M.; CORAZZA, F.C. Dynamic optimization of the mashing process. **Food Control**, v. 20, p. 1127–1140, 2009.

EATON, B. An overview of brewing. In: Fergus G. Priest; Graham G. Stewart. **Handbook of Brewing**. 2 ed. Taylor & Francis Group, LLC. 2006. 829p.

ESSERY, R.E. Refractive indices, specific gravities, and solution factors of solutions of the solids of wort, cold-water extract and beer. **Brewing Industry Research Foundation**, v.60, p. 21-28, 1954.

FAGRELL, B.; DE FAIRE, U.; BONDY, S.; CRIQUI, M.; GAZIANO, M.; GRONBAEK, M.; JACKSON, R.; KLATSKY, A.; SALONEN, J.; SHAPER, A. G. The effects of light to moderate drinking on cardiovascular diseases. **Journal of Internal Medicine**. v. 246, p. 331-340, 1999.

FERREIRA, A. **Cervejarias Artesanais no Brasil**. 2016. Disponível em: <<https://www.institutodacerveja.com.br/noticias/n113/novidades/ervejarias-artesanais-no-brasil>>. Acesso em: 15 jan. 2017

FONSECA, G. G.; DE CARVALHO, N. M. B.; GOMBERT, A. K. Growth of the yeast *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556 on different sugar combinations as sole carbon and energy source. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5055-5067, 2013.

GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Methods for the Vibrational Spectroscopy of beer. In: **Beer in Health and Disease Prevention**. Elsevier Inc., 2009.

GHASEMI-VARNAMKHAZI, M.; MOHTASEBI, S.S.; RODRIGUEZ-MENDEZ, M.L.; GOMES, A.A.; ARAÚJO, M.C.U.; GALVÃO, R.K.H. Screening analysis of beer ageing using near infrared spectroscopy and the Successive Projections Algorithm for variable selection. **Talanta**, v. 89, p. 286-291, 2012.

GODFREYSEN, S.E.; OTTESEN, M. Maturation of beer with  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase. **Carlsberg Research Communications**. v. 47, p.93-102, 1982.

GÓES, L. **Como se faz... cerveja?** 2014. Disponível em <<http://campoamesa.blogspot.com.br/2014/05/como-se-faz-cerveja.html> > Acesso em: 15.jan. 2017.

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; VARGAS-ALBORES, F.; OCHOA, J-L.; PAREDES-LOPEZ, O.; SCHELER, CH.; SALNIKOW, J.; MARTIN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG, S. Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data. **Food Chemistry**, v. 67, p. 71-78, 1999.

GOTSICK, J.T.; BENSON, R.F. HPLC analysis of carbohydrates important to beer brewing using an aminopropyl stationary phase. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 14, p. 1887-1901, 1991.

GRASSI, S.; AMIGO, J.M.; LYNDGAARD, C.B.; FOSCHINO, R.; CASIRAGHI, E. Beer fermentation: Monitoring of process parameters by FT-NIR and multivariate data analysis. **Food Chemistry**, v. 155, p. 279–286, 2014.

HILL, P.G.; SMITH, R.M. Determination of sulphur compounds in beer using headspace solidphase microextraction and gas chromatographic analysis with pulsed flame photometric detection. **Journal Chromatography A**, v. 872, p. 203, 2000.

HOBBS, L. Sweeteners from starch: Production, Properties and Uses. In: **Starch: Chemistry and Technology**, 3ed., Elsevier Inc, 2009.

HUGHES, P.S.; BAXTER, D. An overview of the malting and brewing process. In: **Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects**. RSC PaperBacks, 2001

INSIŃSKA-RAK, M.; SIKORSKA, E.; CZERWIŃSKA, I.; KRUZIŃSKA, A.; NOWACKA, G.; SIKORSKI, M. Fluorescence spectroscopy for analysis of beer. **Polish journal of food and nutrition sciences**. v. 57, p. 239-243, 2007.

JIN, D. R.; MIYAHARA, T.; OE, T.; TOMOOKA, T. Determination of D-Amino Acids Labeled with Fluorescent Chiral Reagents, R(2)- and S(1)-4-(3-Isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazoles, in Biological and Food Samples by Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 124, 1999.

JONES, B.L.; BUDDE, A.D. How various malt endoproteinase classes affect wort soluble protein levels. **Journal of Cereal Science**, v. 41, p. 95–106, 2005.

KROTTENTHALER, M.; BACK, W.; ZARNKOW, M. Wort Production. In: Eßlinger, H.M. **Handbook of Brewing**, WILEY-VCH, 2009.

LAPERRE, Y. **The beer sector in brazil**. Flanders Investment & Trade, 2015.

LEI, H.; ZHENG, L.; WANG, C.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 76–83, 2013.

LLARIO, R.; IÑÓN, F.A.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M. Determination of quality parameters of beers by the use of attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. **Talanta**, v. 69, p. 469–480, 2006.

MacGREGOR, A. W.; BAZIN, S.L.; MACRI, L.J.; BABB, J.C. Modelling the Contribution of Alpha-Amylase, beta-amylase and limit dextrinase to starch degradation during mashing. **Journal of Cereal Science**, v. 29, p. 161–169, 1999.

MacWILLIAM, I. C. Wort composition- a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 74, p. 38, 1968.

MADIGAN, D.; McMURROUGH, I.; SMYTH, M.R. Determination of Proanthocyanidins and Catechins in Beer and Barley by Highperformance Liquid Chromatography With Dual-electrode Electrochemical Detection. **Analyst**. v. 119, p. 863, 1994.

MANLY, B. J. F. **Métodos estatísticos multivariados: uma introdução**. Porto Alegre: Editora Artmed Bookman, 2008. 229 p.

Manual VARIAN: UV-VIS. Disponível em < <https://www.nist.gov/sites/default/files/documents/ncnr/E136uvvis.pdf> >. Acesso em 24 jan. 2017

MARINELLI, B.A.L; WHITNEY, B.Sc.D. Gas liquid chromatography of wort and beer carbohydrates. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 73, p. 35-39, 1967

MCDONALD, E.J. Refractive indices of maltose solutions. **Journal of Research of the National Bureau of Standards**, v. 46, p. 165-167, 1951.

McMEEKIN, T.L.; GROVES, M.L.; HIPPI, N.J. Refractive Indices of Amino Acids Proteins and Related Substances. In: **Amino Acids and Serum Proteins**; Stekol, J.; American Chemical Society: Washington, DC, 1964.

MIGNANIA, A.G.; CIACCHERIA, L.; MENCAGLIA, A.A.; OTTEVAERE, H.; BACA, E.E.S.; THIENPONT, H. Optical measurements and pattern-recognition techniques for identifying the characteristics of beer and distinguishing Belgian beers. **Sensors and Actuators B**, v. 179, p. 140-149, 2013.

MINGOTI, S. A. **Análise de dados através de métodos de estatística multivariada: uma abordagem aplicada**. Belo Horizonte-MG: Editora UFMG, 2005. 295 p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Manual de Métodos de Análises de Bebidas e Vinagres: Método 8- sólidos solúveis (°Brix)**. 2015. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/metodos/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa/nao-alcoolicos-08-solidos-soluveis-o-brix.pdf/view> >. Acesso em: 10 jan. 2017

MIWA, H.; YAMAMOTO, M. Determination of mono-, poly- and hydroxy-carboxylic acid profiles of beverages as their 2-nitrophenylhydrazides by reversed-phase ion-pair chromatography. **Journal Chromatography A**. v. 721, p. 261, 1996.

MUNROE, J.H. Fermentation. p. 487-524. In: Fergus G. Priest; Graham G. Stewart. **Handbook of Brewing**. 2 ed. Taylor & Francis Group, LLC. 2006. p.829.

- PALMER, J.J. **How to Brew**. 3 ed. Brewers Publications, 2006. 347 p.
- PIATO, M.S.; RÉVILLION, J.P. Restrições ao desenvolvimento das microcervejarias informais no Brasil. **Acta Ambiental Catarinense**, v. 10, p. 7-18, 2013.
- PICKERELL, A. T. W.; HWANG, A.; AXCELL, B. C. Impact of Yeast-Handling Procedures on Beer Flavor Development During Fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. v. 49, p. 87, 1991.
- PLANALTO. **DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JULHO DE 2009**. Disponível em: < >. Acesso em: 14 jan. 2017.
- POLSHIN, E.; AERNOUTS, B.; SAEYS, W.; DELVAUX, F.; DELVAUX, F.R.; SAISON, D.; HERTOOG, M.; NICOLAÏ, B.M.; LAMMERTYN, J. Beer quality screening by FT-IR spectrometry- Impact of measurement strategies, data pre-processings and variable selection algorithms. **Journal of Food Engineering**, v. 106, p. 188–198, 2011.
- PUSECKER, K.; ALBERT, K.; BAYER, E. Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of highperformance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Journal Chromatography A**, v. 836, p. 245, 1999.
- REINOLD, M. R. **Manual Prático de Cervejaria**. 1.ed. São Paulo: Aden Editora, 1997. 213p.
- ROCHA, A.C.P.; SILVA, J.R.; LIMA, S.M.; NUNES, L.A.O.; ANDRADE, L.H.C. Measurements of refractive indices and hermo-optical coefficients using a white-light Michelson interferometer. **Applied Optics**, v. 55, p.6639-6643, 2016.
- RUSSELL, I. Yeast, p. 281-332 In: Fergus G. Priest; Graham G. Stewart. **Handbook of Brewing**. 2 ed. Taylor & Francis Group, LLC. 2006. p.829.
- SALLES, A. **Anuário CervBrasil 2015**. Disponível em: < [http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO\\_CB\\_2015\\_WEB.pdf](http://www.cervbrasil.org.br/arquivos/ANUARIO_CB_2015_WEB.pdf) >. Acesso em: 19 jan. 2017.

SIKORSKA, E.; CHMIELEWSKI, J.; KOZIOŁ, J.; KHMELINSKII, I.V.; HERANCE, R.; BOURDELANDE, J.L.; SIKORSKI, M. Photo-induced features of some lager beers. **Polish journal of food and nutrition sciences**. v. 12/53, p. 113-118, 2003.

SIKORSKA, E.; GLISZCZYN´SKA-S´WIGŁO, A.; INSIN´SKA-RAK, M.; KHMELINSKII, I.; KEUKELEIRE, D.D.; SIKORSKI, M. Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. **Analytica chimica acta**, v.613, p. 207-217, 2008.

SIKORSKA, E.; GORECKI, T.; KHMELINSKII, I. V.; SIKORSKI, M.; KEUKELEIRE, D. Monitoring beer during storage by fluorescence spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 96, p. 632, 2006.

SIKORSKA, E.; GÓRECKI, T.; KHMELINSKII, I.V.; SIKORSKI, M.; KEUKELEIRE, D.D. Fluorescence Spectroscopy for Characterization and Differentiation of Beers. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, p. 267-275, 2004.

SINDCERV- Sindicato Nacional da Industria da Cerveja. **Cerveja e Saúde**. Disponível em: < <http://www.sindcerv.com.br/cerveja-saude.php> >. Acesso em: 15 jan. 2017.

SKOOG, D. A.; HOLLER F.J.; NIEMAN, J. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5 ed. Porto Alegre-RS: Bookman, 2002.

STEVENS, J.F.; TAYLOR, A.W.; CLAWSON, J.E.; DEINZER, M.L. Fate of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops to Beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47 p. 2421, 1999.

STEWART, G.G. The Horace Brown Medal Lecture: Forty Years of Brewing Research. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 115, p. 3-29, 2009.

TAN, C.-Y.; HUANG, Y.-X. Dependence of Refractive Index on Concentration and Temperature. **Journal of Chemistry & Engineering Data**, v. 60, p 2827–2833, 2015.

TAN, J.; LI, R.; JIANG, Z-T. Chemometric classification of Chinese lager beers according to manufacturer based on data fusion of fluorescence, UV and visible spectroscopies. **Food Chemistry**, v. 184, p. 30–36, 2015.

TING, P.L.; GOLDSTEIN, H. Preparation and Purification of Hop Acids and Their Derivatives. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 54, p. 103, 1996.

VARNAM, A. H.; SUTHERLAND, J. P. Bebidas alcohólicas: I. Cerveza. In: **Bebidas: Tecnologia, Química y Microbiología**. Zaragoza: Acribia, S.A., 1997. 487p.

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas Alcoólicas**- Ciência e Tecnologia. 1 ed. São Paulo: Editora Blücher, 2010.

VENTURINI, W. G. Cerveja. In: **Tecnologia de Bebidas**. 1.ed. São Paulo: Edgard Blücher, 2005. 550p.

## CAPÍTULO 3– Espalhamento de luz dinâmica para detectar o *gushing* primário da cerveja

### 3.1- Fundamentação Teórica

O fenômeno chamado “*gushing*” é uma expulsão de líquido que ocorre espontaneamente de forma violenta e incontrolado imediatamente após abrir-se uma garrafa de bebida gaseificada (Figura 3.1(a)) (HAIKARA et al., 2000; HINZMANN, 2009). A palavra “*gushing*” vem do inglês e significa jorro. O *gushing* na cerveja foi relatado pela primeira vez em 1909, e foi descrito como uma espuma forte e um estouro depois de abrir a garrafa de cerveja sem agitação (Figura 3.1(b)). Este fenômeno foi observado também com outras bebidas, como sidra (WILSON, 1999), embora seja mais relevante em cerveja (PELLAUD, 2002).



(a)



(b)

**Figura 3.1-** Efeito do *gushing* primário imediatamente após a garrafa ser aberta. (a) hidrofobinas classe II em água gaseificada. (b) cerveja contaminada com hidrofobina classe II.

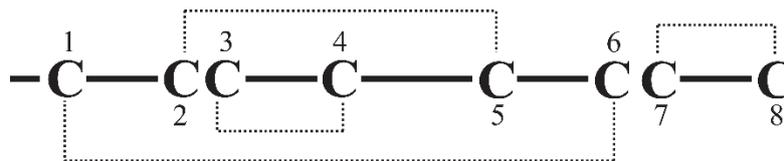
Na década de 1960, o *gushing* foi dividido em dois tipos (primários e secundários) dependendo da sua origem. O *gushing* secundário é proveniente de partículas orgânicas ou inorgânicas que aparecem na cerveja devido a falhas no processo de fabricação. Essas partículas podem atuar como sítios de nucleação para o CO<sub>2</sub>, resultando em uma rápida liberação de gás que conduz a formação de excesso de espuma na bebida. As partículas que podem gerar este efeito são: cristais de oxalato de cálcio, íons metálicos (ferro ou metais pesados). Resíduos de produtos de limpeza, abrasão de tampas e materiais de filtro também foram relatados como possíveis causadores do *gushing* secundário. Fatores como carbonatação excessiva, alta temperatura no envasamento, ou volume maior no gargalo da cerveja também podem ocasionar este efeito. Desta forma, o *gushing* secundário é caracterizado por ser esporádico em determinada cervejaria. Assim, pode-se eliminar este efeito com boas práticas de fabricação, e com monitoramento mais rigoroso do processo (GARBE et al., 2009).

O *gushing* primário ocorre periodicamente e epidemicamente geralmente depois de temporadas húmidas, e afeta uma produção inteira de cerveja (CASEY, 1996). Este efeito é causado por maltes contaminados, principalmente por fungos durante o processo de malteação (LUTTERSCHMID et al., 2010). Assim, este efeito está relacionado com a qualidade da matéria prima utilizada na fabricação e se torna mais preocupante para os produtores de malte (DECKERS et al., 2012b). Alguns fungos foram identificados como promovedor do *gushing* primário, sendo eles: *Fusarium sp.*, *Aspergillus*, *Nigrospora*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma* e *Stemphylium* (GYLLANG & KJELLEN, 1981). Estudos comprovaram que esses fungos possuem como característica a produção de material de superfície ativa que formam uma película sólida em torno das moléculas de CO<sub>2</sub> presentes na cerveja, isolando-as (GARDNER, 1973). Mais tarde descobriu-se que esse material era uma proteína, produzida como metabolismo dos fungos e foi identificada com hidrofobina (CASEY, 1996). Finalmente, podemos escrever que o *gushing* primário ocorre quando a cerveja é fabricada com a cevada que foi contaminada durante seu crescimento com um tipo particular de proteína gerada por um fungo, chamada hidrofobina (HAIKARA, 2006; NOOTS et al., 1998; SARLIN et al., 2005; SARLIN et al., 2007).

### 3.1.1- Hidrofobinas- principal ativadora do *gushing* primário

As hidrofobinas são proteínas extracelular de superfície-ativa produzida por fungos filamentosos, principalmente por *Funsarium sp.* e *Thricoterna ressi* (LINDER et al., 2005; LINDER, 2009; SARLIN et al., 2005), sendo uma pequena proteína anfipática. Essa proteína tem massa molecular entre 7 e 15 kDa com aproximadamente 100 aminoácidos. Para o fungo são de extrema importância, podendo exibir diversas funções. Elas cobrem a parede celular de hifas (filamento do micélio dos fungos) aéreas sendo responsáveis por repelirem a água. Nos cogumelos frutíferos, as hidrofobinas cobrem as paredes dos poros e impedem que estes fiquem encharcados com água (BIDOCHKA et al., 1995; STRINGER & TIMBERLAKE, 1995; WESSELS et al., 1991). Na infecção das plantas pelos fungos a hidrofobina tem participação direta, pois facilitam o contato entre as células do fungo e a superfície das plantas (TALBOT et al., 1993). A maior característica está relacionada a alta atividade de superfície, sendo que as hidrofobinas podem reduzir a tensão superficial da água de 72 para 43 mJ/m<sup>2</sup>, podendo ser menor dependendo da sua concentração, ou purificação da amostra (ASKOLIN, 2006; LUMSDON et al., 2005). Com este poder de diminuir a tensão superficial, as hidrofobinas permitem que os micélios escapem do meio aquoso e formem estruturas aéreas (WOSTEN et al., 1999; WOSTEN et al., 2001).

As hidrofobinas possuem estrutura diversificada, porém elas contêm oito resíduos de cisteína (aminoácido polar) em posições fixas, sendo característica comum, conforme mostrado na Figura 3.2 (LINDER et al., 2005). Esses resíduos formam ligações fortes com dissulfetos, sendo representado na figura pelas ligações entre as cisteínas 1-6, 2-5, 3-4 e 7-8, estas ligações resultam em uma estrutura secundária compacta e rígida que proporciona a esta proteína elevada estabilidade estrutural contra o desprendimento, a auto- agregação e o tratamento com solventes (ASKOLIN et al., 2006; de VOCHT et al., 2000; SUNDE et al., 2008; TORKKELI et al., 2002). Além disso, em sua estrutura terciária apresenta regiões hidrofóbica e hidrofílica bem definidas (BLIJDENSTEIN et al., 2010; LINDER et al., 2005).



**Figura 3.2-** Estrutura das moléculas de cisteínas, representados pela letra C, que compõe a estrutura primária da hidrofobina. As linhas representam as ligações intramoleculares dos dissulfetos com as cisteínas.

As hidrofobinas se dividem em Classe I e II de acordo com a solubilidade e comparação sequencial (SHOKRIBOUSJEIN et al., 2011). A Classe I engloba as hidrofobinas solúveis somente em trifluoro acético e ácido fórmico, e são produzidas tanto pelos fungos Ascomicetos quanto Basidiomicetos, um exemplo são os SC3 produzidos pelo *Schizophyllum commune*. A Classe II é solúvel em solventes orgânicos, como etanol, e dodecilsulfato de sódio, e são produzidas somente por Ascomicetos; HFBI e HFBII fazem parte dessa classe e são produzidas pelo fungo *Trichoderma reesei* (LINDER et al., 2005). Levando em conta a estrutura das proteínas de cada classe, as duas são similares, porém a Classe I possui mais aminoácidos (100-125 resíduos) que a Classe II (50-100 resíduos), sendo mais diversificada na sequência deste composto. Apesar das diferenças serem poucas, isso leva a propriedades diferentes, a Classe I é mais hidrofóbica e estável, enquanto a Classe II possui mais tendência em formar espuma, sendo esta classe a única que apresentou ser indutora do *gushing* primário (LUTTERSCHMID et al., 2011; SARLIN et al., 2005; SARLIN et al., 2012; STUBNER et al., 2010; ZAPF et al., 2006).

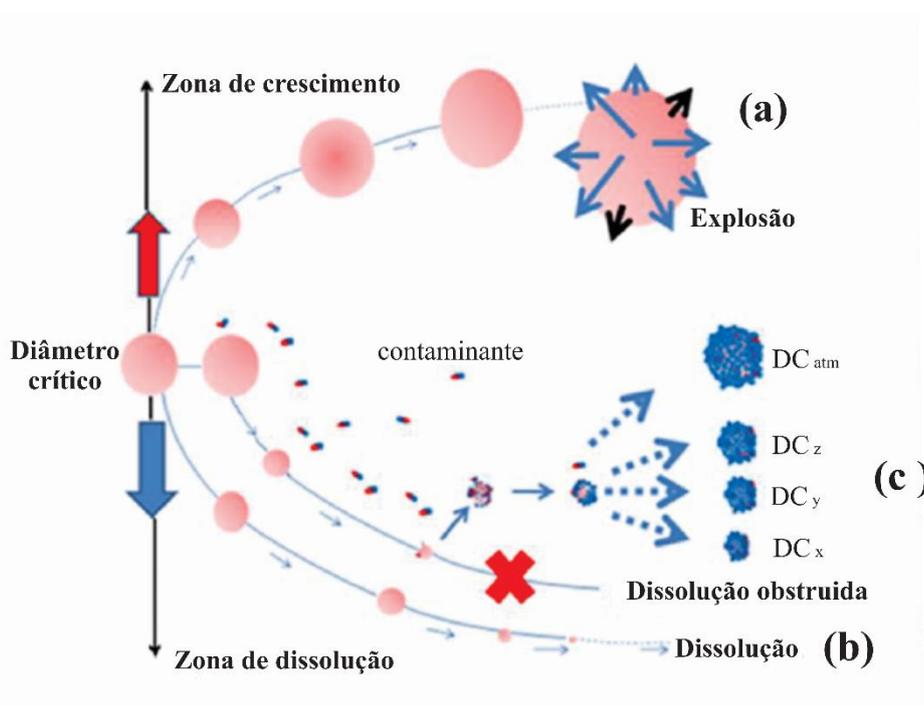
No malte contaminado com o fungo, o crescimento e a produção de hidrofobina podem continuar durante a malteação (OLIVEIRA et al., 2012; SARLIN et al., 2007). Devido à estabilidade das hidrofobinas, podem suportar as condições de aquecimento da brassagem e dos demais processos, e encontrada no produto final, tendo uma concentração de cerca de 10% com relação ao encontrado no malte inicial (SARLIN et al., 2007). Esta porcentagem é suficiente para causar o *gushing* na cerveja (SARLIN et al., 2005; SARLIN et al., 2012).

### 3.1.2- Mecanismo que leva ao surgimento do *gushing* primário

Nos últimos dez anos, as pesquisas avançam para entender o mecanismo do *gushing* primário, principalmente em cerveja. As últimas pesquisas apontam que, pelo menos, dois parâmetros básicos são essenciais para que ocorra este efeito

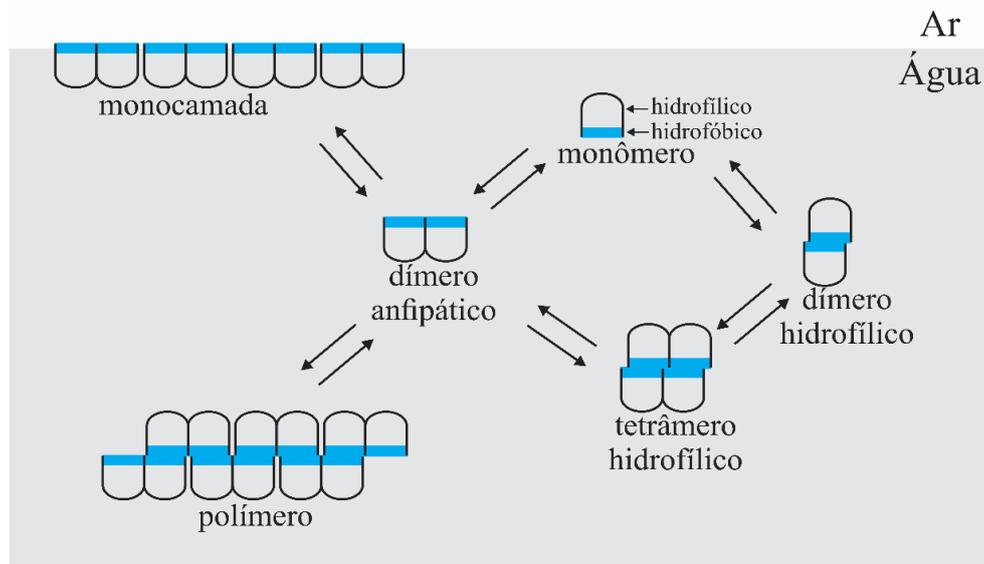
(LUTTERSCHMID et al., 2010; SARLIN et al., 2012; SHOKRIBOUSJEIN et al., 2011), ou seja, moléculas anfipáticas (por exemplo hidrofobinas Classe II) e dióxido de carbono (que proporciona a fonte de gás/energia para formar a espuma).

Assim, para entender o *gushing* primário, é importante destacar algumas propriedades do CO<sub>2</sub> e das hidrofobinas Classe II que está diretamente ligada ao excesso de espuma. Neste estudo, o diâmetro crítico de uma bolha de gás carbônico é a propriedade física mais importante. Durante a saturação de um líquido pode ocorrer três casos diferentes. Primeiro, acima do diâmetro crítico o tamanho das bolhas cresce por difusão até que explodem (Figura 3.3(a)). Abaixo do diâmetro crítico encolhem até à dissolução completa (Figura 3.3(b)), porém se algum contaminante estiver presente não ocorre a dissolução, pois ocorre, mais comumente, a interação da bolha com o contaminante (Figura 3.3(c)) (DECKERS, 2013; SAHU et al., 2006). O que determina o diâmetro crítico é o equilíbrio de três elementos: a pressão ambiente que causa diminuição; a tensão superficial (lei de Young-Laplace), que também causa diminuição; e a pressão química (lei de Henry) causando expansão.



**Figura 3.3-** Representação da evolução do diâmetro crítico de um gás durante a saturação no estado líquido. (a) uma vez que o diâmetro da bolha formada é maior que o diâmetro crítico, esta cresce por difusão até estourar; (b) quando o seu diâmetro é menor que o diâmetro crítico, a bolha encolhe até a dissolução completa; (c) se a solução contém um contaminante, este impede a dissolução completa e estabiliza a bolha com um diâmetro (DC) em função da pressão, sendo DC<sub>atm</sub> à pressão atmosférica, e DC<sub>x</sub>, DC<sub>y</sub>, DC<sub>z</sub> à pressão x, y, e z, respectivamente. (Adaptado de Deckers (2013))

No caso das hidrofobinas Classe II, devido à propriedade anfipática essas moléculas tem a habilidade de se unir em interfaces hidrofóbicas/hidrofílicas (Figura 3.4). Assim, elas podem espontaneamente formar assembleias, ou seja, dímeros e tetrâmeros em solução pela interação hidrofóbica, sendo assim solúvel em soluções aquosas (KISKO et al., 2008; SZILVAY et al., 2006; TORKKELI et al., 2002; WANG et al., 2004). As assembleias de hidrofobinas podem formar monocamadas na interface água/ar, formando uma membrana anfipática estável (HAKANPAA et al., 2004; KALLIO et al., 2007; PAANANEN et al., 2003). As monocamadas provocam alta elasticidade que impactam na tensão superficial (ALEXANDROV et al., 2012; BLIJDENSTEIN et al., 2010; COX et al., 2007; COX et al., 2009).



**Figura 3.4-** Representação esquemática das associações de hidrofobinas. Os monômeros formam dímeros, os quais formam tetrâmeros. Os dímeros anfipáticos precedem a formação das monocamadas na interface. Em concentrações elevadas, o excesso de hidrofobinas formam estruturas fibrilares que são os polímeros. (Adaptado de KALLIO et al. (2007))

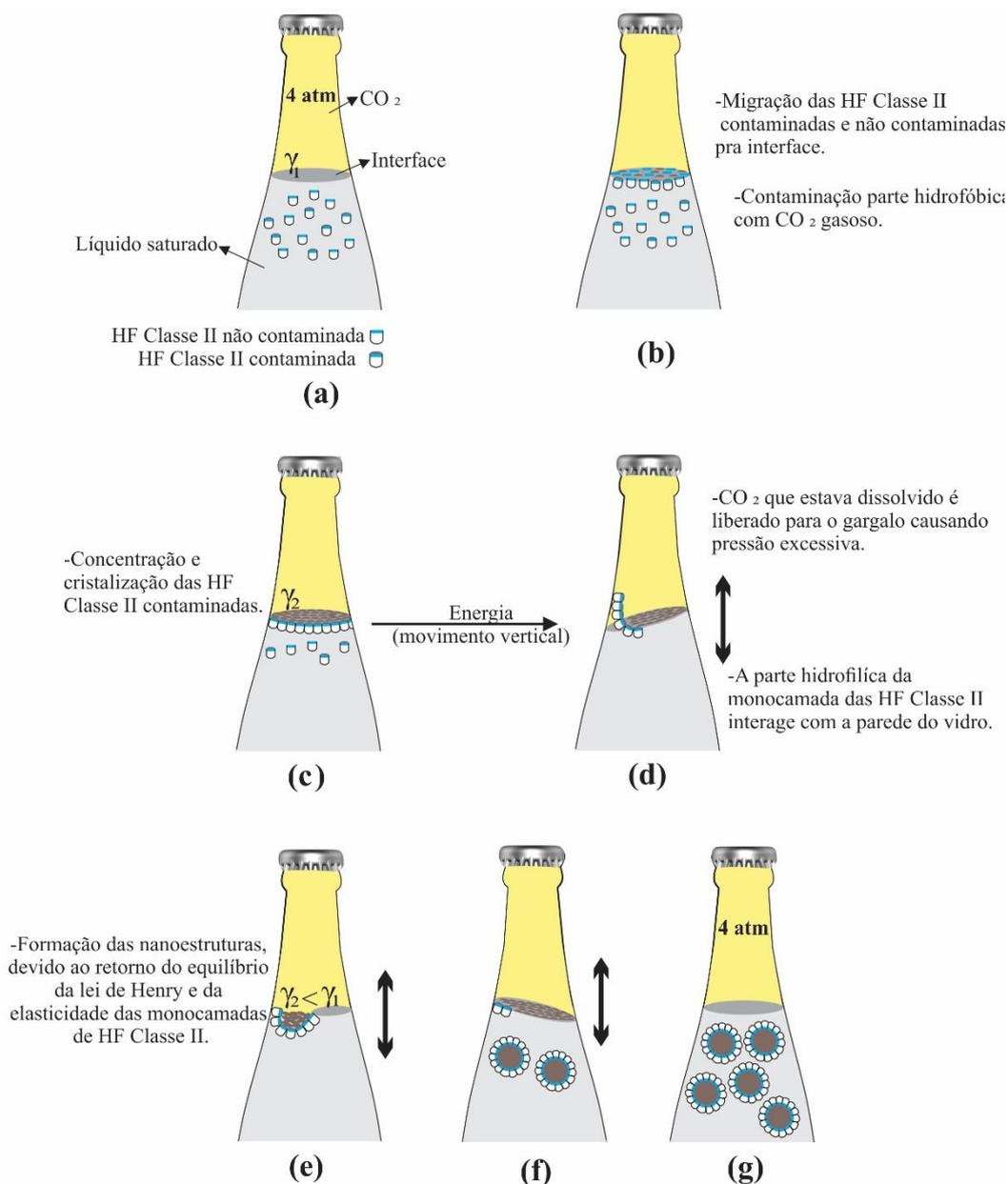
Deckers et al. (2013) descreveu em diferentes fases sucessivas como hidrofobinas Classe II podem formar e estabilizar bolhas gasosas, as quais são responsáveis pelo *gushing* primário ao abrir a garrafa (DECKERS, 2013). Primeiramente, as hidrofobinas presentes no líquido tornam-se totalmente ou em parte contaminada por CO<sub>2</sub> durante o processo de carbonização por injeção de CO<sub>2</sub> gasoso, ou não contaminada totalmente se a carbonização ocorrer por refermentação (Figura 3.5(a)). Devido às suas propriedades

de superfície, as hidrofobinas migram para a interface líquido–gás (ou seja, cerveja-CO<sub>2</sub> puro) como na presença de uma interface hidrofílico – hidrofóbico; pois, eles preferem se mudar para lá em vez de interagir entre si (Figura 3.5(b)) (COX et al., 2007). Pela sua presença na interface, todas as hidrofobinas ficarão contaminadas pelo CO<sub>2</sub>, devido à presença do CO<sub>2</sub> puro na atmosfera no gargalo da garrafa. Se a quantidade de hidrofobinas Classe II for suficiente, isso permitirá que atinja a concentração crítica necessária para uma auto-assembles em uma monocamada cristalina nesta interface, e conseqüentemente reduzem a tensão superficial (Figura 3.5(c)). Uma vez que esta estrutura é formada, se a energia (por exemplo, da agitação durante o transporte) é dada para o sistema, ocorrendo um desequilíbrio na lei de Henry. Esta lei determina que a uma temperatura determinada, a quantidade de gás dissolvido no líquido é proporcional à pressão parcial, o qual o gás permanece em equilíbrio com o líquido, a Equação 3.1 expressa matematicamente esta lei.

$$p = K_H \times C \quad (\text{Equação 3.1})$$

sendo,  $p$  a pressão parcial do gás acima da solução,  $K_H$  uma constante, e  $C$  a concentração do gás dissolvido (no caso, CO<sub>2</sub>).

O desequilíbrio resultará em trocas de gás entre o líquido e a fase gasosa, a fim de estabelecer novamente o equilíbrio, ou seja, o número de moléculas de CO<sub>2</sub> dissolvidos é reduzido e reconduzido para o gargalo (presença de CO<sub>2</sub> gasoso). Além disso, resultará na atração entre a parede hidrofílica do vidro da garrafa e a parte "hidrofílica" da camada hidrofóbica (Figura 3.5(d)). Ao findar a agitação, o desequilíbrio ainda existirá entre o gargalo e o líquido. Assim, para retomar o equilíbrio as moléculas de CO<sub>2(g)</sub> voltará para o líquido utilizando os sítios de menor tensão superficial, ou seja, onde as hidrofobinas formaram monocamadas. Desta forma, as moléculas de CO<sub>2(g)</sub> se acumulam nesta estrutura das hidrofobinas e irão interagir, preferencialmente, com a parte hidrofóbica da proteína, e esta parte atuará como ancora ou uma cova para a formação de nanobolhas (Figura 3.5(e)). Devido as propriedades elástica da monocamada de hidrofobinas (SZILVAY et al., 2007), as moléculas de CO<sub>2</sub> serão englobadas pelas hidrofobinas fechando a estrutura pela força lateral resultante da lei de Young-Laplace (Figura 3.5(f)), resultando em nanoestruturas circulares estáveis dentro do líquido, até a garrafa ser aberta.



**Figura 3.5-** Esquema de como ocorre a formação de nanobolhas causadas por hidrofobinas Classe II. (a) As hidrofobinas estão presentes na garrafa de cerveja saturada; (b) Devido à sua atividade superficial, as hidrofobinas migram para a interface gás-líquido, sendo contaminadas por  $\text{CO}_2$ ; (c) Na interface, as hidrofobinas contaminadas formam auto-asmbléias (monocamada), e a tensão superficial é reduzida; (d) Devido à agitação, ocorre o desequilíbrio da lei de Henry e uma pressão excessiva é criada no gargalo; ocorre também a interação da parte hidrofílica da monocamada de hidrofobinas com o vidro. (e) Para voltar ao equilíbrio da lei de Henry,  $\text{CO}_2$  gasoso volta para o líquido onde a tensão superficial é a menor. Devido às propriedades elásticas da monocamada, o  $\text{CO}_2$  gasoso acumula nesta estrutura. (f) As bolhas são finalmente fechada pela força lateral resultante da lei de Young-Laplace. (g) O frasco fechado contém nanobolhas estabilizadas por uma camada de hidrofobinas. (Adaptado de DECKERS (2013))

Ao abrir a garrafa, as ligações entre as hidrofobinas e as moléculas de  $\text{CO}_2$  irão se romper, liberando energia e ocasionando numerosos locais de nucleação no líquido. Este

conjunto de efeitos leva a uma forte expulsão de gás, causando o *gushing* primário. Para entender este processo, as nanoestruturas formadas pela hidrofobina e as moléculas de CO<sub>2</sub> podem ser considerados como um sistema compreendido por uma membrana (monocamada de hidrofobina) que engloba uma quantidade de gás ideal (CO<sub>2</sub>). Neste caso, a lei de Boyle-Mariotte para gás será válida, e é dada por:

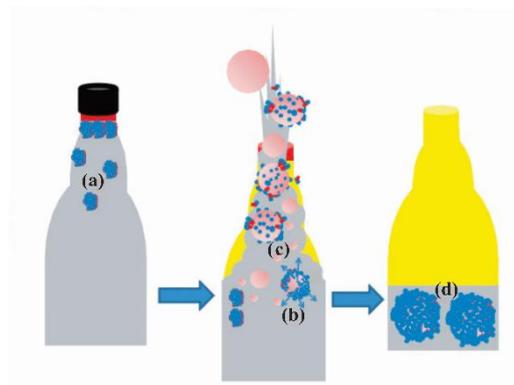
$$P = \frac{nRT}{V} \quad (\text{Equação 3.2})$$

sendo,  $P$  a pressão,  $V$  o volume,  $T$  a temperatura,  $n$  o número de moles do gás e  $R$  a constante dos gases.

As nanoestruturas podem ser consideradas como esferas, assim, o volume é calculado por  $V = (4/3)\pi r^3$ . Usando a equação de Young-Laplace obtemos uma relação entre a diferença de pressão ( $\Delta P$ ) (dentro e fora da estrutura) e a tensão superficial ( $\gamma$ ) para estrutura esférica ( $r$  de raio) pela Equação 3.3.

$$\Delta P = \frac{4\gamma}{r} \quad (\text{Equação 3.3})$$

Ao aumentar a diferença de pressão, as hidrofobinas não resistem à tendência das moléculas de CO<sub>2</sub> a escapar devido ao fenômeno de difusão de gás. Desta forma, as ligações entre CO<sub>2</sub> e hidrofobinas se rompem e as moléculas de CO<sub>2</sub> são libertadas. Ao liberar CO<sub>2</sub>, ocorre a indução da nucleação que produz uma espuma forte no gargalo gerando o *gushing* (Figura 3.6).

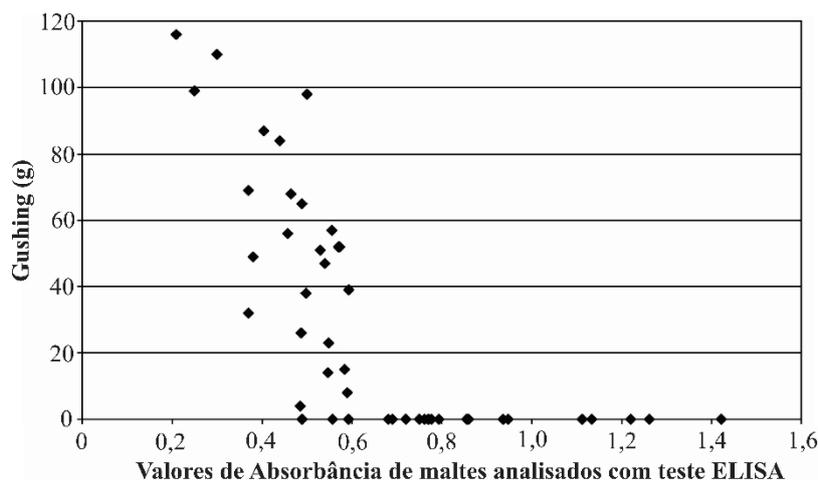


**Figura 3.6** Esquema da evolução do efeito *gushing* formado pela interação entre hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub> instantes antes e depois de abrir a garrafa. **(a)** a garrafa fechada, o diâmetro das bolhas é determinado pela pressão interna; **(b)** e **(c)** ao abrir a garrafa as nanoestruturas crescem e explodem, resultando na liberação de CO<sub>2</sub> que induz o *gushing*; **(d)** após o efeito na garrafa sobram as nanoestruturas que não sofreram o efeito tendo diâmetro determinado pela pressão atmosférica. (Adaptado de SPECKER (2014))

### 3.1.3- Técnicas de detecção

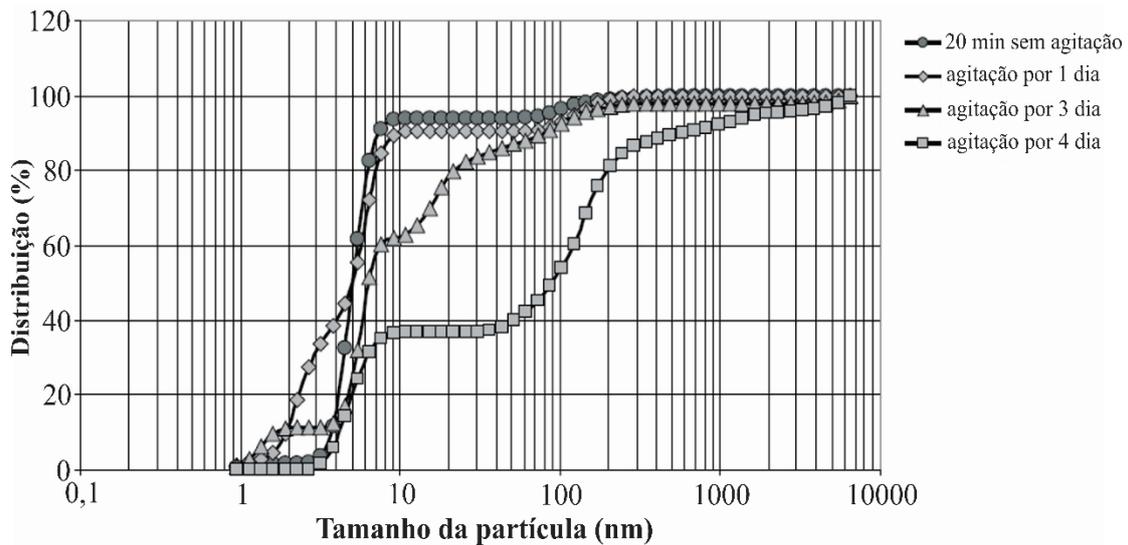
Diversas técnicas já foram desenvolvidas para detectar o *gushing* primário. Devido a este *gushing* estar relacionado as matérias-primas contaminadas, a maioria dos testes são feitos para a cevada e o malte. O teste mais comumente aplicado por cervejeiros é chamado Teste de Carlsberg modificado (MCT- modified Carlsberg test, do inglês), que foi descrito por VAAG et al. (1993) e modificado por RAUTE et al. (1995) (GARBE et al., 2009). Este teste consiste em adicionar água gaseificada em uma certa quantidade de extrato de malte aquoso e acondicionar em uma garrafa, a qual é posta em movimento horizontal por três dias, após este período a garrafa é aberta, sendo que a quantidade de líquido perdido é a quantidade de *gushing* gerada pelo malte, esta quantidade é medida pela diferença de massa entre a garrafa antes e depois de aberta. Porém a quantidade de *gushing* gerado pode variar mesmo usando o mesmo malte e as mesmas quantidades de solução gerando falta de reprodutibilidade, por isso esta técnica é utilizada somente de forma qualitativa, ou seja, para saber se o malte tem potencial para gerar o *gushing* (CHRISTIAN et al., 2011; HAIKARA, et al., 2005; HAIKARA et al., 2006).

SARLIN et al. (2005) desenvolveu um método chamado ELISA competitivo (do inglês, Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) e foi patenteado por HAIKARA et al. (2006). Este teste consiste em determinar as hidrofobinas em uma reação imunológica entre o antígeno da hidrofobina e um anticorpo. Os grãos são triturados e extraídos com fosfato de sódio e cloreto de sódio (1:10) e centrifugados para recolher o sobrenadante e são adicionados anticorpos contra a hidrofobina de *F. poae* D182, e então são encubados. Após incubação, as misturas são transferidas para imunoplasmas revestidas com um extrato de hidrofobina de *F. poae* D182 e é utilizado um anticorpo secundário. Uma segunda encubação é feita durante 30 min à temperatura ambiente, logo em seguida mede-se a absorvância das amostras a 405 nm. Neste método, quanto menor a absorvância mais elevada será a quantidade de hidrofobinas na amostra. A Figura 3.7 mostra o teste feito pelos autores, quando compararam o potencial do malte para o *gushing* utilizando o teste ELISA, quando a absorvância é menor que 0,6 o malte utilizado tem maior potencial para gerar o *gushing* primário. Os testes de validação mostraram que o ELISA não distingue concentrações de hidrofobinas maiores que  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo um limitante para quantificar completamente o potencial para o *gushing*. Além disso, o método exige um tempo elevado de preparação.



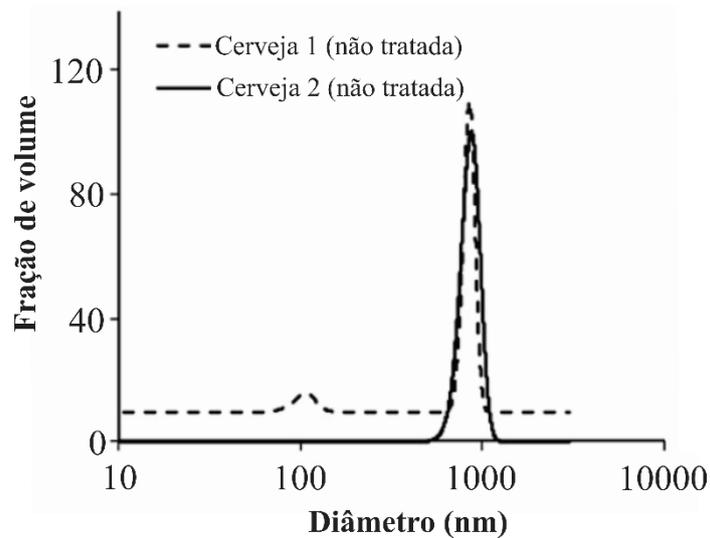
**Figura 3.7-** Relação entre o potencial do malte para o *gushing* e os valores de absorvância de amostras de malte analisados com o teste ELISA. (Traduzido de SARLIN et al. (2005))

Novos métodos para identificar compostos com potencial para *gushing* estão sendo desenvolvidos nos últimos anos, pois procura-se por métodos mais eficaz e rapidez em suas análises. CHRISTIAN et al. (2009) estudou o potencial de alguns surfactantes com potencial para causar o *gushing* e utilizou um método de análise do tamanho de partículas para monitorar os efeitos dos compostos com moléculas de CO<sub>2</sub> (proveniente de água gaseificada). Somente o composto cloreto de hexadecil trimetil amônio interagiu com moléculas de CO<sub>2</sub> provocando *gushing*, e para observar essa interação essas amostras passaram por períodos de agitação diferentes, e logo após o tamanho das partículas foram analisadas, como mostrado na Figura 3.8. Na figura, os tamanhos de partícula existentes são reconhecidos pela inclinação da curva, quanto mais inclinada for a curva maior a quantidade de partículas detectadas, e o curso horizontal significa que não existe partículas presente na amostra com os tamanhos correspondentes. A distribuição de partículas revelou partículas pequenas de 3-9 nm e partículas maiores de aproximadamente 200 nm, que foram caracterizados como agregações de micelas. Partículas com aproximadamente 100 nm também aparecem, e são caracterizadas como partículas provenientes da interação das moléculas de CO<sub>2</sub> com o composto cloreto de hexadecil trimetil amônio, o qual induz o *gushing*.



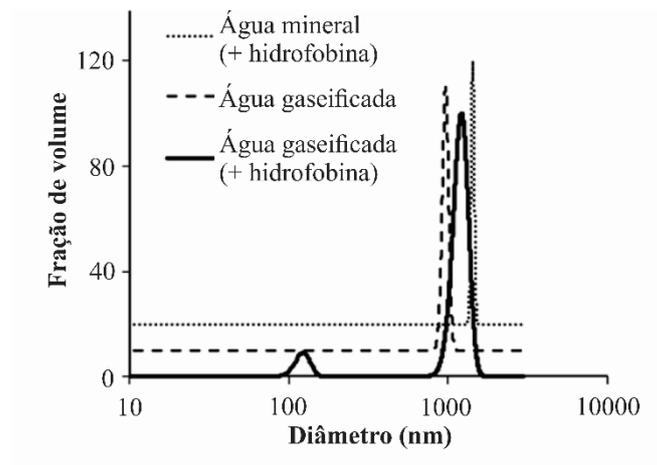
**Figura 3.8-** Distribuição do tamanho de partículas em água gaseificada com cloreto de hexadecil trimetil amônio relacionando o tempo de agitação das amostras analisadas. (Traduzido de CHRISTIAN et al. (2009))

Em 2011, DECKERS et al. usou um analisador de partículas pela técnica de Espalhamento de luz dinâmica (DLS- do inglês Dynamic Light Scattering) para detectar partículas que provocam o *gushing* primário em cervejas. Neste estudo, eles utilizaram cervejas comerciais e induziram o *gushing* com hidrofobinas classe II (extraídas do fungo *Trichoderma reesi*), e deixaram as garrafas serem agitadas por três dias para que houvesse interação da proteína com as moléculas de CO<sub>2</sub>. Ao abrir as garrafas, o líquido expulso pelo efeito *gushing* foi coletado e analisado pelo DLS, é importante dizer que com esta metodologia as amostras foram analisadas à pressão atmosférica (1 atm). A Figura 3.9 mostra a distribuição das partículas encontradas para a amostra de cerveja que apresentou o efeito *gushing* e para que não apresentou tal efeito. A diferença entre as amostras foi apresentada pela cerveja com *gushing*, que revelou partículas com aproximadamente 100 nm, sendo inexistente na cerveja sem *gushing*. Assim, os autores identificaram essas partículas como sendo provenientes da interação entre as moléculas da proteína hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub>.



**Figura 3.9-** Distribuição do tamanho da partícula em amostra de cerveja com *gushing* (cerveja 1), e cerveja que não apresentou *gushing* (cerveja 2). (Traduzido de DECKERS et al. (2011))

Neste mesmo trabalho os autores testaram garrafas com soluções de hidrofobinas em água mineral, água gaseificada ( $7 \text{ gL}^{-1}$  de  $\text{CO}_2$ ), comparando também somente a água gaseificada. A Figura 3.10 mostra a distribuição de partículas encontrada em cada amostra. Observou-se que somente a amostra que apresenta moléculas de  $\text{CO}_2$  e a proteína hidrofobina contem partículas com aproximadamente 100 nm, confirmando que a interação entre a proteína e moléculas de  $\text{CO}_2$  geram partículas com este tamanho e são capazes de provocar *gushing* primário.



**Figura 3.10-** Distribuição do tamanho da partícula em amostra de água com e sem hidrofobinas. (Traduzido de DECKERS et al. (2011))

O método DLS é usado rotineiramente para caracterizar proteínas e suas interações (BOLEAN et al., 2011; HE et al., 2010; JAECKELS et al., 2016; MINTON, 2016), e apresentou-se como um dos métodos mais vantajosos para caracterizar o *gushing* primário. Entre as vantagens incluem: sensibilidade para medir pequenas partículas, amplo range de tamanho (comumente 0,1 nm a 10  $\mu$ m), possibilita medidas de amostras turvas, e apresenta acurácia e reprodutibilidade.

### **3.1.4- Teoria sobre a técnica de Espalhamento de luz dinâmica**

A técnica de espalhamento de luz dinâmica é a mais popular para determinar tamanho de partículas (XU, 2015). Este método determina a distribuição de tamanho das partículas que sofrem movimento Browniano em solução, monitorando a dependência temporal da intensidade da luz espalhada pelo meio (SCHMITZ, 1990). O movimento Browniano de uma partícula em um líquido é devido ao desequilíbrio instantâneo nas forças combinadas exercidas pelas colisões da partícula com as moléculas líquidas que o rodeiam. Em 1905, Albert Einstein relatou a teoria sobre esses movimentos (GOLDBURG, 1999), que apresentaremos mais adiante.

Na maioria dos sistemas DLS, um laser de comprimento de onda conhecido passa através de uma amostra em solução, e a intensidade de luz dispersa é recolhida por um fotodetector e deconvoluída por algoritmos para determinar a distribuição de tamanho das partículas presentes. Quando as partículas são muito pequenas quando comparadas com o comprimento de onda da luz (tipicamente menor que  $d=\lambda/10$ ), a intensidade da luz espalhada é uniforme em todas as direções (espalhamento Rayleigh). A intensidade da luz espalhada é dependente do ângulo de espalhamento, o tamanho e o índice de refração relativo das partículas. As posições de “speckles” (ou seja, pontos brilhantes de interferência construtiva) mudam devido ao movimento Browniano aleatório das partículas, e, assim, ocorre flutuações temporais na intensidade da luz. O tamanho das partículas está relacionado com essas flutuações temporais. As partículas menores exibem flutuações mais rápidas que partículas maiores.

É possível medir diretamente o espectro de frequências contidas nas flutuações (HUNTER, 2001), porém, a melhor maneira é extrair informações dessas flutuações construindo uma função de correlação com o tempo (BERNE & PECORA, 2000), que é um sinal projetado para medir o grau de semelhança entre um sinal com o mesmo sinal em intervalos de tempo variáveis, definido como:

$$G^{(2)}(q, \tau) = \langle I_S(\mathbf{q}, 0) I_S(\mathbf{q}, \tau) \rangle \quad (\text{Equação 3.4})$$

sendo  $\tau$  é a correlação da diferença de tempos;  $I_S$  é a intensidade da luz espalhada; e  $q$  é uma constante chamada “vetor da onda espalhada”, e está relacionada com o comprimento de onda do laser utilizado ( $\lambda$ ), o ângulo de detecção ( $\theta$ ) e o índice de refração do solvente ( $n$ ), pela seguinte equação  $q = \left(\frac{4\pi n}{\lambda}\right) \text{sen } \theta/2$ .

A função de correlação examina as mudanças na intensidade do espalhamento durante períodos de tempo para um volume de partículas. Após uma série de cálculos, é encontrada a constante de decaimento ( $1/\tau$ ) que é inversamente proporcional ao coeficiente de difusividade ( $D$ ), de acordo com:

$$\frac{1}{\tau} = 2Dq^2$$

$$D = \left(\frac{1}{2q^2}\right) \left(\frac{1}{\tau}\right) \quad (\text{Equação 3.5})$$

Sendo o coeficiente de difusão conhecido o raio hidrodinâmico pode ser determinado usando a teoria de Einstein para o movimento Browniano. A teoria de Einstein utiliza o coeficiente de difusão ( $D$ ) para o deslocamento quadrático médio ( $x$ ) de uma partícula Browniana, sendo que o deslocamento de uma partícula com movimento Browniano não é proporcional ao tempo transcorrido ( $t$ ), mas sim a sua raiz quadrada, pela equação:

$$\langle x^2 \rangle = 2Dt \quad (\text{Equação 3.6})$$

Einstein calculou o coeficiente de difusão correlacionando as quantidades físicas mensuráveis. Nesta parte ele considera uma força que atua sobre partículas em solução, e que essas partículas interagem como esferas rígidas (com raio  $r$ ) e se movem com certa velocidade ( $v$ ) (GOLDBURG, 1999). Se essas partículas foram imersas em um fluido com viscosidade ( $\eta$ ), a força atuante é dada pela lei de Stokes. Com essas relações, o coeficiente de difusão é dado por:

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta rN} \quad (\text{Equation 3.7})$$

sendo  $T$  a temperatura,  $R$  a constante universal dos gases, e  $N$  o número de Avogadro. Esta equação é conhecida como equação de Stokes-Einstein.

O raio que é obtido por esta técnica é o raio de uma esfera que tem o mesmo coeficiente de difusão de translação que a partícula medida. De forma geral, o princípio da técnica DLS é relacionar a luz espalhada com o coeficiente de difusão das partículas e usar a função de correlação para calcular a distribuição de tamanho das partículas no meio.

### 3.2- Objetivos

Devido aos bons resultados obtidos na detecção de partículas relacionadas ao *gushing* primário pelo DLS, e os estudos feitos por DECKERS et al. (2011), neste trabalho continuamos esta pesquisa, sendo uma complementação dos estudos previamente citados. Assim, objetivo foi estudar a interação da proteína Hidrofobinas classe II com moléculas de CO<sub>2</sub> utilizando a técnica de DLS à pressão maior que a atmosférica, e em sistema fechado.

Além dos estudos feitos no produto final, as pesquisas avançam na detecção da influência da proteína no processo de brassagem, pois quanto antes se detectar o malte contaminado menos impacto sofrerá o processo industrial. Por isso, neste trabalho também se propõe o monitoramento do processo de brassagem com a técnica DLS, utilizando-se de maltes com e sem contaminação do fungo *Trichoderma reesei* que gera a proteína causadora do *gushing*.

### 3.3- Materiais e Métodos

#### 3.3.1- Produção de hidrofobina HFBII

Foram utilizados hidrofobinas de classe II (do tipo HFBII) extraídas a partir de *Trichoderma reesei* MUCL 44908 que foram cultivadas em meio líquido contendo lactose (40 g/L), peptone (5 g/L), extrato de levedura (1,25 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (5 g/L), (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (3,5 g/L), MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,75 g/L), CaCL<sub>2</sub> (0,75 g/L), CoCL<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (40 mg/L), MnSO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (32 mg/L), ZnSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (10 mg/L), com pH ajustado para 5, e foi encubado por 5 dias a 25°C. Depois, este meio foi centrifugado a 8500 rpm durante 15

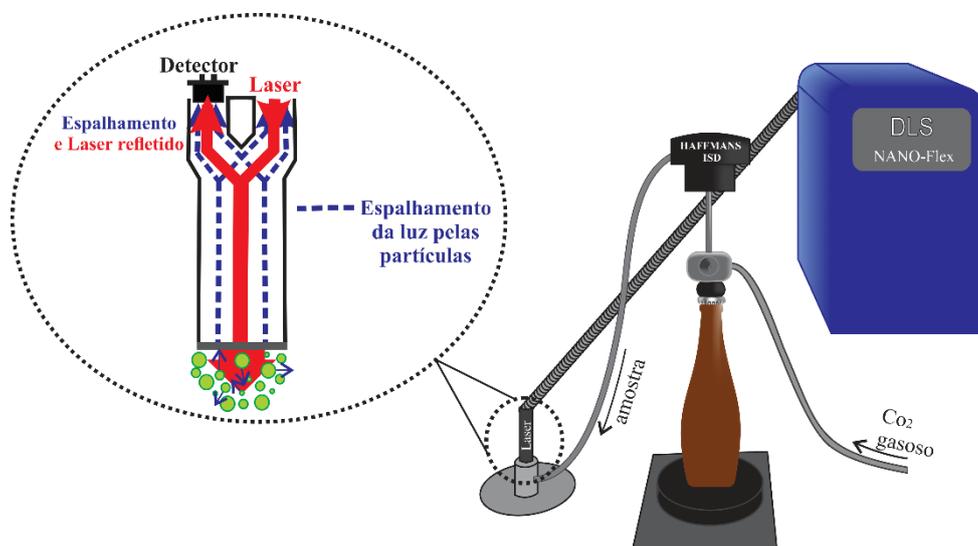
minutos para separar o micelânio do líquido, sendo o líquido coletado para posterior purificação. As hidrofobinas foram centrifugadas usando a técnica de fracionamento por espuma de CO<sub>2</sub>, descrito por KHALESI et al. (2013). HFBII foi purificada por cromatografia em fase reversa (coluna 6.4 × 100 mm; GE Healthcare) com gradiente de diluição de 0,1% TFA (ácido trifluoroacético) em água MilliQ ( fase A) e 0,1% TFA em acetonitrila (fase B). Depois, o eluente foi monitorado por detecção UV no comprimento de onda de 214 nm. Frações entre 35-50% de acetonitrila são positivas para hidrofobinas purificadas. Essas frações foram coletadas e confirmadas por espectrometria de massa MALDI-TOF (matrix laser desorption ionization time of flight) usando instrumento Ultraflex II em modo linear com  $\alpha$ -ciano-4-hidroxi ácido cinâmico (Brüker Daltonics, GmbH).

### **3.3.2- Caracterização da interação de Hidrofobina com moléculas de CO<sub>2</sub> por DLS**

Para detectar partículas referentes a interação da proteína com moléculas de CO<sub>2</sub> à alta pressão, a técnica DLS foi aplicada a um sistema fechado, para não haver alterações no sistema, principalmente da pressão. O tamanho das partículas foi determinado por um analisador de partículas NANO-flex 180°. As garrafas com as amostras (descritas a seguir) foram postas no equipamento HAFFMANS ISD (iSD E-4 /12 © 2012 Pentair, Inc.), as quais se mantiveram na posição vertical e antes de abrir foi inserido CO<sub>2</sub> gasoso no gargalo, garantindo assim que não ocorre variação da pressão interna da garrafa. Nessa condição criamos um sistema fechado, no qual um tubo é inserido dentro da garrafa, transferindo uma alíquota do líquido (amostra) pressurizado para a célula (ParticleMetrix-Nano FLEX) que contém o laser e o detector (Figura 3.11).

O laser é direcionado para a amostra via uma fibra ótica e uma janela de safira. A mesma fibra coleta a luz espalhada pelas partículas em um ângulo de 180°, essa luz é guiada até o detector de diodo. A janela de safira reflete uma pequena porção do laser, o qual é forçado a seguir o caminho para o detector, desta forma, o laser refletido e a luz espalhada das partículas se interferem no detector. Este equipamento detecta o movimento browniano das partículas, assim devido a esse movimento a intensidade da luz espalhada está em constante mudança. Essas flutuações são notadas no tempo, que é analisado por equações de autocorrelação. As equações de autocorrelação medem o grau de similaridade entre um sinal com ele mesmo de acordo com sua variação no tempo.

Com essa correlação obtém-se a distribuição do tamanho das partículas em um gráfico que é baseado na intensidade da luz espalhada das partículas.



**Figura 3.11-** Esquema do equipamento utilizado para medir as nanopartículas a alta pressão. A amplificação mostra o esquema do funcionamento do equipamento ao coletar o espalhamento da luz provocado pela interação do laser com a amostra.

Esse experimento foi aplicado a fim de analisar as influências da diferença de pressão e concentração de proteína (hidrofobina) no tamanho de partículas gerados da interação entre hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub>. Primeiramente foi testado a influência da pressão, assim foram utilizadas garrafas de cerveja (330 mL) a quais acrescentaram-se água gaseificadas (a 2°C contendo 7 gCO<sub>2</sub>L<sup>-1</sup> - SPA®) e HFBII (1,7 mgL<sup>-1</sup>). As partículas foram medidas a alta pressão (4 atm) que é normalmente usada em garrafas de cerveja, utilizando o equipamento descrito acima. Depois este sistema foi aberto para a pressão baixar lentamente até 1atm, então o sistema foi fechado novamente e as partículas foram medidas novamente. A influência da concentração de hidrofobina foram verificadas para três concentrações: 2,0; 1,5 e 1,0 mgL<sup>-1</sup>. As amostras foram feitas com água gaseificada (a 2°C contendo 7 gCO<sub>2</sub>/L - SPA®) e HFBII. Antes do teste com DLS, todas as amostras foram agitadas por 3 dias a 80 rpm em posição vertical a 25°C, para acelerar a interação entre a proteína e o CO<sub>2</sub>.

Para confirmar a presença do efeito *gushing* foram feitas amostras controle da mesma forma que as citadas acima. Essas amostras foram averiguadas com o teste Carlsberg modificado. Neste experimento, depois da agitação das amostras, estas foram pesadas, e deixada em repouso por 10 min e depois manualmente viradas para baixo três

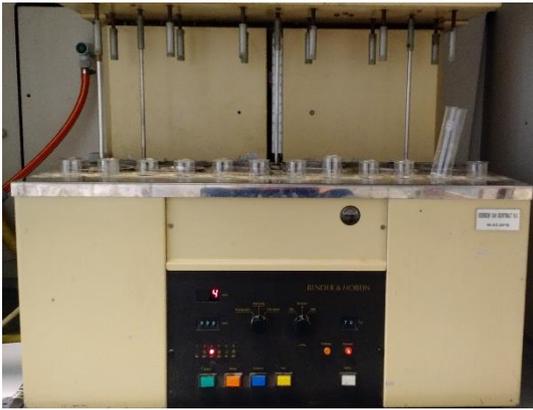
vezes, com intervalos de 10 s. Depois de 30 s em repouso, as garrafas foram abertas, e visto o efeito. Ao término do efeito, as garrafas foram pesadas novamente, e a diferença entre o peso final e o inicial é utilizado como quantidade de *gushing*, sendo positivo quando esta quantidade exceder 20 gL<sup>-1</sup>. Esse teste foi feito em triplicata.

Para última análise foram induzidos o *gushing* em garrafas de cervejas comerciais. Utilizou-se seis marcas de cervejas comum encontradas nos mercados da Bélgica, tendo diferentes teores alcoólicos. Em laboratório, abriu-se as garrafas e acrescentou-se diferentes concentrações de hidrofobina Classe II (HFBII). As garrafas foram fechadas novamente e agitadas por 3 dias a 80 rpm em posição vertical a 25°C, para acelerar a interação entre a proteína e o CO<sub>2</sub> contido nas amostras. O efeito *gushing* foi verificado com o teste Carlsberg modificado, e as amostras que continham alta concentração de proteína foram testadas no sistema fechado do DLS.

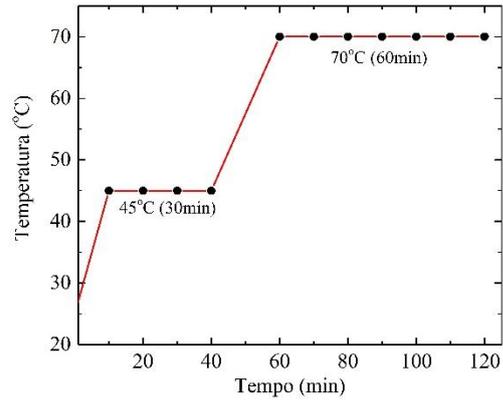
### **3.3.3- Caracterização do processo de brassagem com DLS**

Foram utilizados malte da variedade *Azurel* (Bélgica) que geram o efeito *gushing* pois está contaminado pelo fungo *Trichoderma reesei* proveniente da etapa de malteação; e malte da variedade *Sebastian* (Bélgica) que não proporciona o efeito.

O processo de brassagem foi realizado em escala laboratorial com o equipamento mostrado na Figura 3.12(a). Foram utilizadas duas rampas de temperatura, a primeira à 45°C por 30 min, e a segunda à 70°C por 60 min. Foram coletadas amostras de 2 mL de 10 em 10 min em cada rampa, conforme Figura 3.12(b), sendo utilizado 200 mL de água destilada para 50 g de malte. As brassagens foram feitas em duplicata tanto para o malte contaminado quanto para o não contaminado. Após a coleta das alíquotas, estas foram imediatamente congeladas, para cessar a atuação enzimática. Antes da análise as alíquotas foram centrifugadas à 200 rpm.



(a)



(b)

**Figura 3.12-** (a) Equipamento utilizado para fazer brassagem em escala laboratorial. (b) Representação gráfica das rampas de temperaturas utilizadas em todas as brassagens. Os pontos pretos representam as alíquotas coletadas em cada patamar.

Para analisar o tamanho das partículas foi utilizado o analisador de partículas NANO-flex 180°. Foram coletados 20  $\mu$ L de cada amostra e analisadas diretamente no laser com o detector. A Figura 3.13 mostra o equipamento utilizado.



**Figura 3.13-** Equipamento de espalhamento de luz dinâmica Nano-Flex 180°. A amostra é colocada para análise diretamente no laser.

### 3.4- Resultados e Discussão

#### 3.4.1- Influência da variação de pressão na interação hidrofobina-CO<sub>2</sub>

DECKERS et al. (2011) constatou em seus experimentos com o DLS, que à pressão atmosférica a interação entre a hidrofobina e o CO<sub>2</sub> criam partículas com diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente de 100 nm. À pressão atmosférica (1 atm) as partículas são maiores que em meios com alta pressão devido aos efeitos físicos de

temperatura e pressão. Com esta informação é possível determinar o diâmetro hidrodinâmico crítico à 4 atm, esta pressão é a mesma encontrada dentro de uma garrafa de cerveja fechada. Aplicando a lei de Boyle-Mariotte, mantendo-se a temperatura e o número de mols constantes, temos:

$$P_{1atm} \times V_{1atm} = constant = P_{4atm} \times V_{4atm}$$

Sendo o volume à 1 atm:

$$V_{1atm} = \frac{4}{3} \times \pi r_{1atm}^3 = \frac{4}{3} \times \pi (50nm)^3 = 5.24 \times 10^5 nm^3,$$

Assim, calculando para o raio das partículas à 4 atm, temos:

$$V_{4atm} = \frac{P_{1atm} \times V_{1atm}}{P_{4atm}}$$

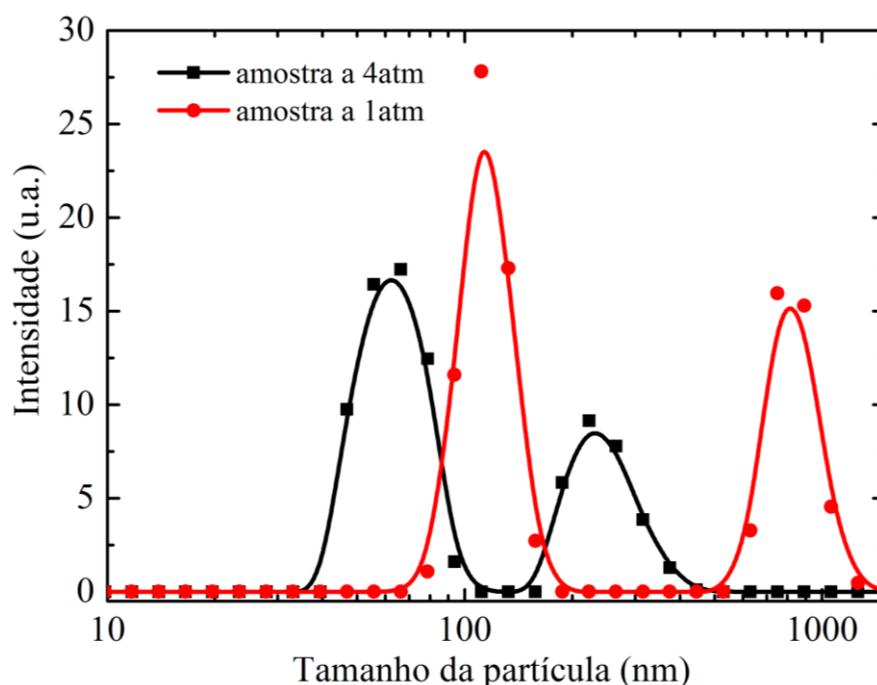
$$\frac{4}{3} \times \pi r_{4atm}^3 = \frac{P_{1atm} \times V_{1atm}}{P_{4atm}}$$

$$r_{4atm} = \sqrt[3]{\frac{3(P_{1atm} \times V_{1atm})}{4\pi P_{4atm}}}$$

$$r_{4atm} = 31.5 nm$$

Desta forma, o diâmetro hidrodinâmico teórico da interação entre a hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub> à 4 atm é aproximadamente de 63 nm. A fim de detectar essas partículas, a técnica de DLS no sistema fechado foi aplicada às amostras que apresentaram *gushing*. Primeiramente foram testadas as amostras-controle para quantificar o efeito *gushing* pelo teste Carlsberg modificado. A quantidade de *gushing* foi de aproximadamente 550 g/L. A Figura 3.14 mostra a distribuição do tamanho de partículas obtida a diferentes pressões (1 e 4 atm) na mesma garrafa contendo água gaseificada e hidrofobinas (1,7 mg/L). Para as garrafas à 4atm foram encontradas partículas de aproximadamente 65nm de diâmetro hidrodinâmico. Após isso, a mesma garrafa foi desgaseificada vagarosamente pelo gargalho, desta forma a pressão foi normalizada atingindo a pressão atmosférica (1 atm), e medida novamente, encontrando-se partículas com 110 nm de diâmetro. Quando a pressão de dentro da garrafa muda, as partículas são afetadas assim como seu diâmetro. As partículas encontradas à 4 atm de aproximadamente 60 nm é muito próximo do encontrado teoricamente (63 nm). A presença dessas partículas confirma a teoria que a interação entre hidrofobinas classe II e moléculas de CO<sub>2</sub> gera “nanobombas” de acordo com a teoria de DECKERS et al. (2012). Nesta interação o CO<sub>2</sub> acumula nas estruturas próximas às assembleias de hidrofobinas e

assim interage com a parte hidrofóbica da proteína. Essa interação resulta em partículas chamadas nanobombas capaz de provocar *gushing* quando as garrafas são abertas. À pressão atmosférica a interação hidrofobina-CO<sub>2</sub> cria nanopartículas com 100 nm de diâmetro hidrodinâmico (DECKERS et al., 2011; DECKERS et al., 2012a), mas em uma garrafa fechada na qual a pressão é maior (4 atm) essas partículas são menores (60 nm).



**Figura 3.14-** Média da distribuição do tamanho de partículas de garrafas contendo água com gás e hidrofobina classe II (1.7 mg/L) comparando diferentes pressões (1 e 4 atm).

As hidrofobinas tem a tendência de ficar em superfícies ar-líquido ou gás-líquido, entretanto quando a parte hidrofóbica interage com as moléculas de CO<sub>2</sub>, isso faz com que as partículas formadas nessa interação retornem para dentro do líquido. Desta forma, a detecção dessas partículas em uma parte do líquido coletado confirma que CO<sub>2</sub> estabilizados com hidrofobinas estão presentes em todo o líquido dentro da garrafa e não somente na interface gás-líquido.

Partículas com aproximadamente 230 nm à 4 atm e 829 nm à 1atm foram encontradas e podem ser provenientes de monômeros (dímeros ou polímeros) formados pela proteína em solução que não interagiu com as moléculas de CO<sub>2</sub>.

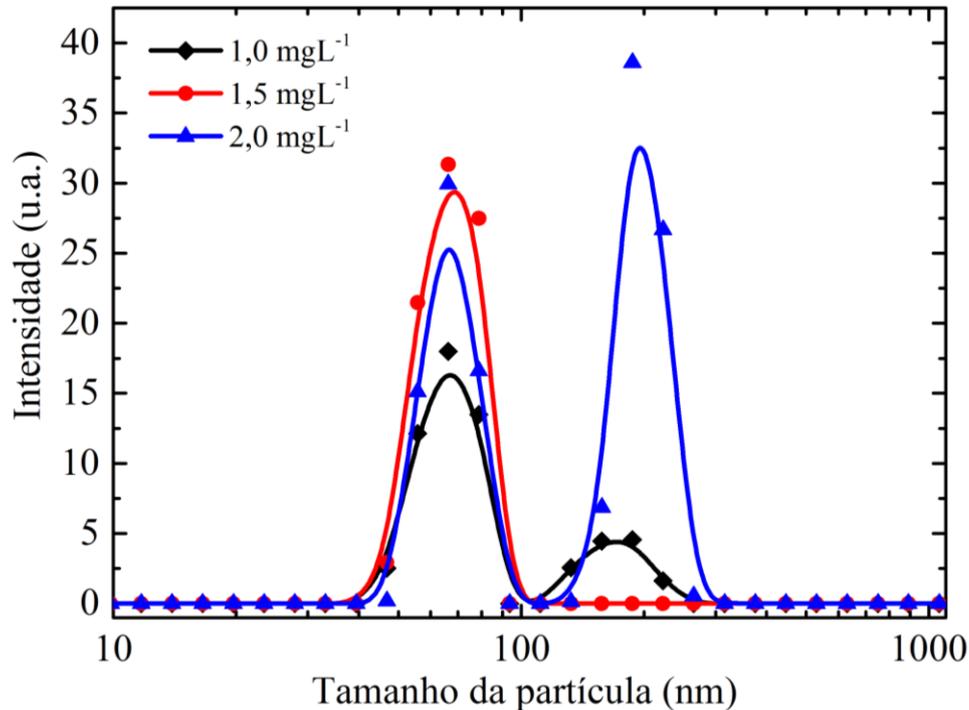
### 3.4.2- Influência da concentração na interação hidrofobina-CO<sub>2</sub>

Conforme a quantidade de hidrofobina aumenta dentro da garrafa a quantidade *gushing* gerado também aumenta (RIVEROS et al., 2015; SARLIN et al., 2012). Para verificar a influência da concentração de hidrofobina com o tamanho de partículas, investigamos três concentrações: 2,0; 1,5 e 1,0 mg/L. A Tabela 3.1 mostra os resultados obtidos no teste de Carlsberg modificado, sendo observado um aumento no efeito *gushing* conforme aumenta-se a concentração de hidrofobinas Classe II.

**Tabela 3.1-** Quantidade de espuma (*gushing*) quantificado pelo teste Carlsberg modificado.

Concentração de HFBII (mgL <sup>-1</sup> )	Quantidade de <i>Gushing</i> (±SD) (g <sup>L</sup> -1)
1,0	374 (27)
1,5	528 (10)
2,0	620 (19)

A distribuição do tamanho das partículas pode ser vista na Figura 3.15, e revela que o tamanho do diâmetro hidrodinâmico não varia com a concentração, todas as amostras apresentaram partículas com tamanho aproximado de 66 nm. Podemos inferir que a concentração da proteína não afeta o tamanho das partículas formadas pela interação entre a hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub>. A quantidade de nanobombas criadas por essa interação pode variar com a concentração, e assim, ocorre a facilitação do surgimento de mais sitio de nucleação e por consequência uma quantidade maior de espuma com a concentração da proteína. Partículas de aproximadamente 200 nm mostrado na Figura 3.15 pode ser proveniente de aglomerados da proteína que não tenham interagido com as moléculas de CO<sub>2</sub>.



**Figura 3.15-** Média da distribuição do tamanho das partículas de garrafas contendo diferentes concentrações de hidrofobinas e água com gás à pressão de 4atm.

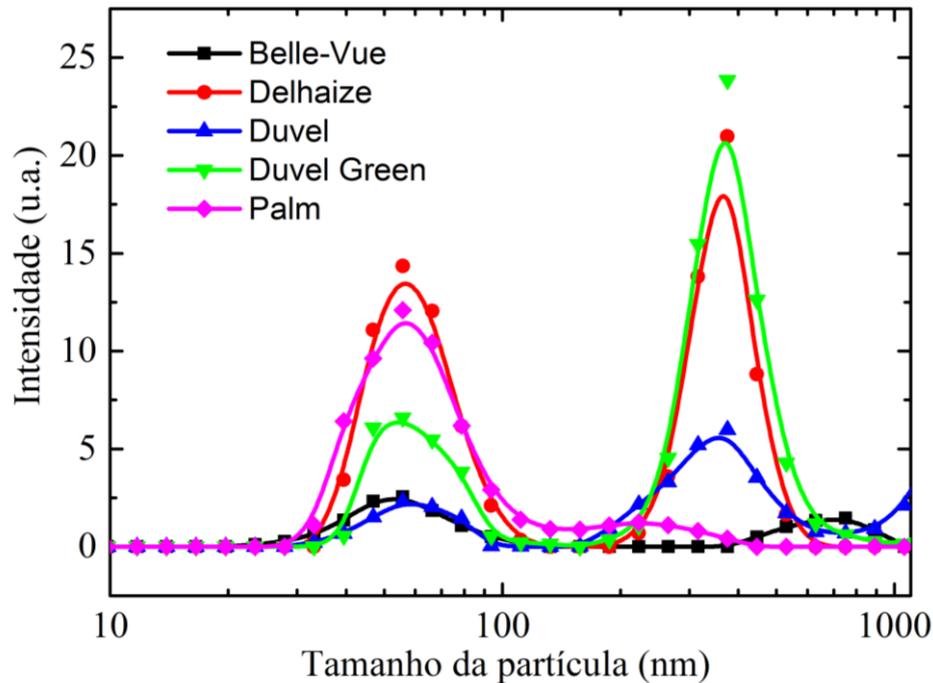
### 3.4.3- Detecção das partículas de interação hidrofobina-CO<sub>2</sub> em cervejas comerciais

Nesta parte do trabalho foram inseridas diferentes concentrações de hidrofobinas em cervejas comerciais para verificar se nesta configuração ocorreria a interação entre a hidrofobina e as moléculas de CO<sub>2</sub> presentes nas garrafas. O teste do efeito *gushing* foi verificado pelo teste de Carlsberg modificado, os resultados são apresentados na Tabela 3.2. Cinco marcas apresentaram *gushing* em todas as concentrações de hidrofobinas testado, observa-se que nas cervejas que contem baixo percentual alcoólico (4,8 e 5,5%) a quantidade de *gushing* produzido foram similares em todas as concentrações, isso pode ter ocorrido devido a hidrofobina ter se ligado com todos as moléculas de CO<sub>2</sub> disponíveis, sendo que até a menor concentração de hidrofobina ter sido capaz de capturar todas essas moléculas. As demais cervejas testadas, com teor alcoólico elevado, tiveram variação na quantidade de *gushing* de acordo com a concentração de hidrofobinas.

**Tabela 3.2-** Quantidade de espuma (*gushing*) quantificado pelo teste Carlsberg modificado para diferentes marcas de cervejas comerciais em diferentes concentrações de hidrofobinas.

<b>Cervejas (volume alcoólico)</b>	<b>Quantidade de <i>gushing</i> (gL<sup>-1</sup>)</b>	<b>Concentração de HFBII (µg mL<sup>-1</sup>)</b>
Delhaize 1 (4,8%)	470	3,20
Delhaize 2 (4,8%)	472	4,80
Delhaize 3 (4,8%)	466	6,40
Delhaize 4 (4,8%)	Testado com DLS	8,00
Belle-Vue 1 (5,5%)	430	3,20
Belle-Vue 2 (5,5%)	470	4,80
Belle-Vue 3 (5,5%)	370	6,40
Belle-Vue 4 (5,5%)	Testado com DLS	8,00
Duvel green 1 (7%)	54	3,20
Duvel green 2 (7%)	121	4,80
Duvel green 3 (7%)	175	6,40
Duvel green 4 (7%)	Testado com DLS	8,00
Palm 1 (6%)	48	2,40
Palm 2 (6%)	251	3,60
Palm 3 (6%)	554	4,85
Palm 4 (6%)	Testado com DLS	6,06
Duvel 1 (8%)	518	2,40
Duvel 2 (8%)	596	3,60
Duvel 3 (8%)	730	4,85
Duvel 4 (8%)	Testado com DLS	6,06

As cervejas com alta concentração de hidrofobinas foram testadas com a técnica de DLS no sistema fechado. A Figura 3.16 apresenta a distribuição do tamanho de partículas detectado para cada cerveja. Todas as amostras apresentaram partículas entre 50 e 65 nm, sendo essas partículas caracterizadas pela interação hidrofobina-CO<sub>2</sub> precursora do efeito *gushing*.

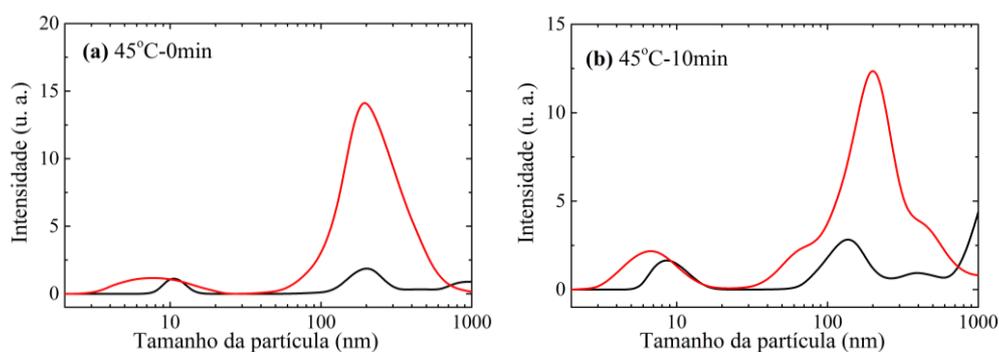


**Figura 3.16-** Média da distribuição do tamanho das partículas detectadas em garrafas de cervejas comerciais à pressão alta pressão.

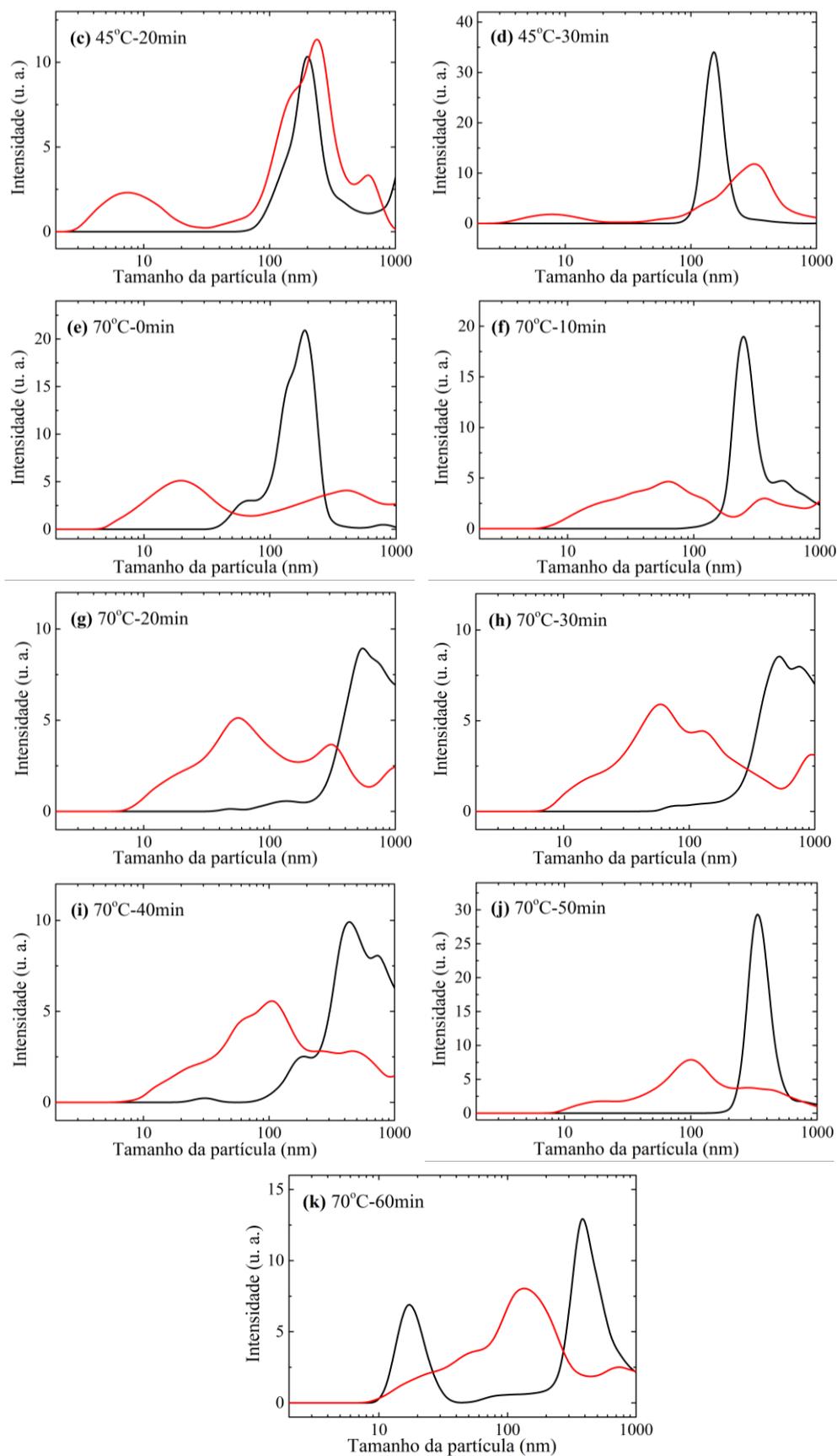
Somente uma das cervejas não apresentaram *gushing*, pois em sua composição existe essências de lúpulo, que é caracterizado como inibidor do efeito. Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos para suprimir o *gushing* primário da cerveja (POSTULKOVA et al., 2016). AASTRUP (2003) relatou que as ações de enzimas proteolíticas inseridas no processo de fabricação da cerveja podem suprimir o efeito do *gushing* primário. Outras pesquisas apresentam que componentes do lúpulo podem apresentar inibir este efeito, HANKE et al. (2009) utilizou linalol e humolones extraídos dos lúpulos para suprimir o *gushing*, SHOKRIBOUSJEIN et al. (2013) relatam a supressão do *gushing* utilizando o extrato de lúpulo chamado lipofílico. A adição de lúpulo diferentes na fabricação também é relatado na literatura, porém devem ser devidamente dosados para não ocorrer um efeito contrário, ou seja, aumentar o *gushing* ao invés de inibir. Algumas indústrias para prevenir que ocorra o *gushing* primário já utiliza em suas receitas esses compostos, principalmente linhagens de lúpulo, como visto na cerveja que não ocorreu o *gushing* induzido pelas hidrofobinas, nem com uma concentração elevada.

### 3.4.4- Detecção de partículas no processo de brassagem

A Figura 3.17 apresenta a distribuição do tamanho das partículas obtidos para cada amostra coletada durante a brassagem comparando o processo com e sem contaminação da proteína hidrofobina que provoca o efeito *gushing*. Observamos que partículas em torno de 10 nm estão presentes em todo o processo de brassagem nas amostras contaminadas, já nas amostras sem contaminação estas mesmas partículas desaparecem na metade da primeira rampa (45°C-20min). Partículas maiores que 150 nm estão presentes em todo o processo tanto para brassagem com contaminação quanto para as brassagem sem contaminação. A principal diferença entre as brassagens, com e sem contaminação, é o surgimento de partículas entre 30 e 80 nm nas brassagem com o malte contaminado ao início da segunda rampa (após amostra 70°C-0min) e permanecem até o termino do processo, estas partículas podem estar ligadas à contaminação do malte pelo fungo *Trichoderma reesei* que gera a proteína hidrofobina causadora do efeito *gushing*. As partículas detectadas com aproximadamente 200 nm estão presentes em todas as etapas da brassagem, estas são provenientes de agrupamentos de proteínas, como albuminas, globulinas e hordeínas que frequentemente se aglomeram durante o processo de brassagem, porém é difícil somente com estas análises distinguir estas proteínas (CELUS et al., 2006).



**Figura 3.17-** Média da distribuição do tamanho das partículas detectadas na brassagem com (linha vermelha) e sem (linha preta) a contaminação do fungo *Trichoderma reesei*. (a) – (b) comparação entre as brassagem em cada amostra coletada.



**Figura 3.17- Continuação** - Média da distribuição do tamanho das partículas detectadas na brassagem com (linha vermelha) e sem (linha preta) a contaminação do fungo *Trichoderma reesei*. (c) – (k) comparação entre as brassagem em cada amostra coletada.

### 3.5- Conclusão

Os estudos apresentados confirmam que interações entre a proteína hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub> ocorrem em sistemas fechados formando nanopartículas estáveis, as quais provocam o efeito de *gushing* primário. Os tamanhos das partículas são menores conforme a pressão aumenta, as análises pela técnica do DLS demonstraram que à pressão atmosférica as partículas têm tamanho aproximado de 100 nm e quando a pressão aumenta para 4 atm o tamanho muda para aproximadamente 60 nm. Assim, com este sistema é possível detectar partículas relacionadas ao *gushing* em garrafas fechadas à alta pressão.

Além disso, os resultados obtidos permitem confirmar que em todas as condições testadas as quais foram detectadas o efeito *gushing*, as moléculas de CO<sub>2</sub> acumulam-se nas estruturas formadas pelas monocamadas de hidrofobinas e interagem com a parte hidrofóbica da proteína, e então as moléculas de CO<sub>2</sub> se tornam enclausuradas pelas hidrofobinas, formando uma estrutura estável de aproximadamente 60 nm à 4 atm. Esse tamanho se torna uma fundamental característica sobre a interação hidrofobina-CO<sub>2</sub> à alta pressão.

Ao inserir hidrofobinas em cervejas comerciais, ocorre interação entre a proteína e as moléculas de CO<sub>2</sub> presentes nas amostras. As amostras testadas com DLS apresentaram partículas com aproximadamente 60 nm, comprovando ser partículas característica do *gushing* primário.

As análises dos tamanhos de partículas como monitoramento do processo de brassagem realizados com maltes contaminados e não contaminados com o fungo *Trichoderma reesei*, revelaram que partículas entre 30 e 80 nm podem ser a interação da proteína hidrofobina com outros componentes da brassagem, pois aparecem somente no mosto contaminado.

### 3.6- Referências Bibliográficas

AASTRUP, S. *Gushing* factors are already present in barley allowing early detection of *gushing* risk, p. 923–929. In: **Proceedings of the European Brewery Convention Congress**, Dublin. Fachverlag Hans Carl, Nürnberg, 2003.

ALEXANDROV, N.A.; MARINOVA, K.G.; GURKOV, T.D.; DANOV, K.D.; KRALCHEVSKY, P.A.; STOYANOV, S.D.; BLIJDENSTEIN, T.B.J.; ARNAUDOV, L.N.; PELAN, E.G.; LIPS, A. Interfacial layers from the protein HFBII hydrophobin: dynamic surface tension, dilatational elasticity and relaxation times. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, p. 296–306, 2012.

ASKOLIN, S. Characterization of the *Trichoderma reesei* hydrophobins HFBI and HFBII, 2006. 104p. PhD (Doctor of Science in Technology). VTT Technical Research Centre of Finland, 2006.

ASKOLIN, S.; LINDER, M.; SCHOLTMEIJER, K.; TENKANEN, M.; PENTTILA, M.; DE VOCHT, M.L.; WOSTEN, H.A.B. Interaction and comparison of a class I hydrophobin from *Schizophyllum commune* and class II hydrophobins from *Trichoderma reesei*. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1295–301, 2006.

BERNE, B.J.; PECORA, R. Dynamic Light Scattering: With Application to Chemistry, Biology and Physics. 3 ed. Dover Publications, 2000. 382p.

BIDOCHKA, M.J.; ST LEGER, R.J.; JOSHI, L.; ROBERTS, D.W. The rodlet layer from aerial and submerged conidia of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* contains hydrophobin. **Mycological Research**, v. 99, p. 403-406, 1995.

BLIJDENSTEIN, T.B.J.; DE GROOT, P.W.N.; STOYANOV, S.D. On the link between foam coarsening and surface rheology: why hydrophobins are so different. **Soft Matter**, v. 6, p. 1799–1808, 2010.

BOLEAN, M.; SIMÃO, A.M.S.; FAVARIN, B.Z.; MILLÁN, J.L.; CIANCAGLINI, P. Thermodynamic properties and characterization of proteoliposomes rich in microdomains carrying alkaline phosphatase. **Biophysical Chemistry**, v. 158, p. 111–118, 2011.

CASEY, G.P. Primary versus secondary *gushing* and assay procedures used to assess malt/beer *gushing* potential. **Master Brewers Association of the Americas TechQuarterly**, v. 33, p. 229–235, 1996.

CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J.A. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. **Journal of Cereal Science**, v. 44, p. 203–211, 2006.

CHRISTIAN, M.; ILBERG, V.; AYDIN, A.A.; TITZE, J.; FRIESS, A.; JACOB, F.; PARLAR, H. New *gushing* mechanism proposed by applying particle size analysis and several surfactants. **Brewing Science**, v. 62, p. 100-107, 2009.

CHRISTIAN, M.; TITZE, J.; ILBERG, V.; JACOB, F. Novel perspectives in *gushing* analysis: a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, p. 295-313, 2011.

COX, A.R.; ALDRED, D.L.; RUSSELL, A.B. Exceptional stability of food foams using class II hydrophobin HFBII. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 366–376. 2009.

COX, A.R.; CAGNOL, F.; RUSSEL, A.B.; IZZARD, M.F. Surface properties of class II hydrophobins from *Trichoderma reesei* and influence on bubble stability. **Langmuir**, v. 23, p. 7995-8002, 2007.

de VOCHT, M.L.; REVIKINE, I.; WOSTEN, H.A.B.; BRISSON, A.; WESSELS, J.G.H.; ROBILLARD, G. T. Structural and functional role of the disulfide bridges in the hydrophobin SC3. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, p. 28428–28432, 2000.

DECKERS, S. Modeling and biophysical characterization of the primary *gushing* mechanism in beer: interaction between gaseous carbon dioxide and class II hydrophobins. 2013. 128p. PhD (Doctor of Bioscience Engineering), KU Leuven, Faculty of Bioscience Engineering, Belgian, 2013.

DECKERS, S.M.; LORGUILLOUX, Y.; GEBRUERS, K.; BAGGERMAN, G.; VERACHTERT, H.; NEVEN, H.; MICHIELS, C.; DERDELINCKX, G.; DELCOUR, J. A.; MARTENS, J. Dynamic Light Scattering (DLS) as a tool to detect CO<sub>2</sub>-Hydrophobin structures and study the primary *gushing* potential of beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 69, p.144-149, 2011.

DECKERS, S.M.; VENKEN, T.; KHALES, M.; GEBRUERS, K.; BAGGERMAN, G.; LORGUILLOUX, Y.; SHOKRIBOUSJEIN, Z.; ILBERG, V.; SCHÖNBERGER, C.; TITZE, J.; VERACHTERT, H.; MICHIELS, C.; NEVEN, H.; DELCOUR, J.;

MARTENS, J.; DERDELINCKX, G.; MAEYER, M.D. Combined Modeling and Biophysical Characterisation of CO<sub>2</sub> Interaction with Class II Hydrophobins: New Insight into the Mechanism Underpinning Primary *Gushing*. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 70, p. 249-256, 2012 a

DECKERS, S.M.; VISSERS, L.; GEBRUERS, K.; SHOKRIBOUSJEIN, Z.; KHALESII, M.; RIVEROS-GALAN, D.; SCHÖNBERGER, C.; VERACHTERT, H.; NEVEN, H.; DELCOUR, J.; MICHIELS, C.; ILBERG, V.; DERDELINCKX, G.; TITZE, J.; MARTENS, J. Doubly Modified Carlsberg Test combined with Dynamic Light Scattering allows prediction of the primary *gushing* potential of harvested barley and malt. **Cerevisia**, v. 37, p. 77–81, 2012 b.

GARBE, L.; SCHWARZ, P.; EHMER, A. Beer *gushing*. In: C. W. Bamforth, Beer: A Quality Perspective. 1 ed. New York: Academic Press Inc. 2009. 304p.

GARDNER, R.J. The mechanism of *gushing* – a review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 79, p. 275-283, 1973.

GOLDBURG, W. I. Dynamic light scattering. **American Journal of Physics**, v. 67, p. 1152-1160, 1999.

GYLLANG, H.; KJELLEN, K. Evaluation of fungal contaminations on barley and malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 87, p. 248-251, 1981.

HAIKARA, A.; KLEEMOLA, T.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; PENTILLÄ, M. Method for determining a *gushing* factor for a beverage. *United States Patent US 7,041,464 B2*. 2006.

HAIKARA, A.; SARLIN, T.; HOME, S. Determination of *gushing* tendency of malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, p. 247-, 2005.

HAIKARA, A.; SARLIN, T.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; PENTTILÄ, M. Method for determining a *gushing* factor for a beverage. *Patent EP 1071949*. 2000.

HAKANPAA, J.; PAANANEN, A.; ASKOLIN, S.; NAKARI-SETALA, T.; PARKKINEN, T.; PENTTILA, M.; LINDER, M.; ROUVINEN, J. Atomic resolution

structure of the HFBII hydrophobin, a self-assembling amphiphile. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 534–539, 2004.

HANKE, S.; KERN, M.; HERRMANN, M.; BACK, W.; BECKER, TH.; KROTTENTHALER, M. Suppression of *gushing* by hop constituents. **Brewing Science**, v. 62, p. 181–186, 2009.

HE, F.; BECKER, G.W.; LITOWSKI, J.R.; NARHI, L.O.; BREMS, D.N.; RAZINKOV, V.I. High-throughput dynamic light scattering method for measuring viscosity of concentrated protein solutions. **Analytical Biochemistry**, v. 399, p. 141–143, 2010.

HINZMANN, E. The *gushing* puzzle-parts are still missing. **Brauwelt International**, v. 27, p. 13-15, 2009.

HUNTER, R.J. Particle size and shape. In: **Foundations of Colloid Science**. 2 ed. New York: Oxford University Press Inc., 2001. 816p.

JAECKELS, N.; MEIER, M.; DIETRICH, H.; WILL, F.; DECKER, H.; FRONK, P. Influence of polysaccharides on wine protein aggregation. **Food Chemistry**, v. 200, p. 38–45, 2016.

KALLIO, J.M.; LINDER, M.B.; ROUVINEN, J. Crystal structures of hydrophobin HFBII in the presence of detergent implicate the formation of fibrils and monolayer films. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 28733–28739, 2007.

KHALESI, M.; VENKEN, T.; DECKERS, S.; WINTERBURN, J.; SHOKRIBOUSJEIN, Z.; GEBRUERS, K.; VERACHTERT, H.; DELCOUR, J.; MARTIN, P.; DERDELINCKX G. A novel method for hydrophobin extraction using CO<sub>2</sub> foam fractionation system. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 372– 377, 2013.

KISKO, K.; SZILVAY, G.R.; VAINIO, U.; LINDER, M.B.; SERIMAA, R. Interactions of hydrophobin proteins in solution studied by small-angle X-ray scattering. **Biophysical Journal**, v. 94, p. 198–206, 2008.

LINDER, M.B. Hydrophobins: Proteins that self assemble at interfaces. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, p. 356–363, 2009.

LINDER, M.B.; SZILVAY, G.R.; NAKARI-SETALA, T.; PENTTILA, M.E. Hydrophobins: the protein-amphiphiles of filamentous fungi. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 877–896, 2005.

LUMSDON, S.O.; GREEN, J.; STIEGLITZ, B. Adsorption of hydrophobin proteins at hydrophobic and hydrophilic interfaces. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v. 44, p. 172-178, 2005

LUTTERSCHMID, G.; MURANYI, M.; STUBNER, M.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. Heterologous expression of surface-active proteins from barley and filamentous fungi in *Pichia pastoris* and characterization of their contribution to beer *gushing*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 147, p. 17–25, 2011.

LUTTERSCHMID, G.; STÜBNER, M.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Induction of *Gushing* with Recombinant Class II Hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* and the Impact of Hop Compounds on its *Gushing* Potential. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 116, p. 339-347, 2010.

MINTON, A.P. Recent applications of light scattering measurement in the biological and biopharmaceutical sciences. **Analytical Biochemistry**, v. 501, p. 4-22, 2016.

NOOTS, I.; DELCOUR, J.A.; MICHIELS, C.W. From field barley to malt: Detection and specification of microbial activity for quality aspects. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, p. 121-153, 1998.

OLIVEIRA, P.M.; MAUCH, A.; JACOB, F.; WATERS, D.M.; ARENDT, E.K. Fundamental study on the influence of *Fusarium* infection on quality and ultrastructure of barley malt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 32–43, 2012.

PAANANEN, A.; VUORIMAA, E.; TORKKELI, M.; PENTTILA, M.; KAURANEN, M.; IKKALA, O.; LEMMETYINEN, H.; SEIMAA, R.; LINDER, M.B. Structural

hierarchy in molecular films of two class II hydrophobins. **Biochemistry**, v. 42, p. 5253–5258, 2003.

PELLAUD, J. *Gushing*: State of the art. **Cerevisia**, v. 27, p. 189-205, 2002.

POSTULKOVA, M.; RIVEROS-GALAN, D.; CORDOVA-AGIULAR, K.; ZITKOVA, K.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G.; DOSTALEK, P.; RUZICKA, M.C.; BRANYIK, T. Technological possibilities to prevent and suppress primary *gushing* of beer. **Trends in Food Science & Technology**, v. 49, p. 64-73, 2016.

RIVEROS, D.G.; SHOKRIBOUSJEIN, Z.; LOSADA-PÉREZ, P.; KHALESİ, M.R.; CORDOVA, K.; MICHIELS, C.; DELCOUR, J.A.; VERACHTERT, H.; WAGNER, P.; DERDELINCKX, G. Comparison of Structure, Sequence, Physical Interactions and its Effects on Primary *Gushing* among Several Class II Hydrophobins. **Brewing Science**, v. 68, p. 38-45, 2015.

SAHU, K.K.; HAZAMA, Y.; ISHIHARA, K.N. *Gushing* in canned beer: the effect of ultrasonic vibration. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 302, p. 356-362, 2006.

SARLIN, T.; KIVIOJA, T.; KALKKINEN, N.; LINDER, M.B.; NAKARI-SETÄLÄ, T. Identification and characterization of *gushing*-active hydrophobins from *Fusarium graminearum* and related species. **Journal of Basic Microbiology**, v. 52, p. 184-194, 2012.

SARLIN, T.; NAKARI-SETÄLÄ, T.; LINDER, M.; PENTTILÄ, M.; HAIKARA, A. Fungal hydrophobins as predictors of the *gushing* activity of malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 111, p. 105-111, 2005.

SARLIN, T.; VILPOLA, A.; KOTAVIITA, E.; OLKKU, J.; HAIKARA, A. Fungal hydrophobins in the barley-to-beer chain. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 113, p. 147-153, 2007.

SCHMITZ, K.S. An introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules. 1 ed. New York: Elsevier Inc., 1990. 449p.

SHOKRIBOUSJEIN, Z.; DECKERS, S.M.; GEBRUERS, K.; LORGUILLOUX, Y.; BAGGERMANC, G.; VERACHTERT, H.; DELCOUR, J.A.; ETIENNE, P.; ROCK, J.M.; MICHIELS, C.; DERDELINCKX, G. Hydrophobins, beer foaming and *gushing*. **Cerevisia**, v. 35, p. 85-101, 2011.

SHOKRIBOUSJEIN, Z.; PHILIPPAERTS, A.; RIVEROS, D.G.; DECKERS, S.M.; KHALESI, M.; MICHIELS, C.; DELCOUR, J.A.; GEBRUERS, K.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G.; SELS, B. Effect of the mashing process on the performance of a lipophilic hop extract to reduce the primary *gushing* of beer. **Cerevisia**, v. 38, p. 71–76, 2013.

SPECKER, C. Analysis of the interaction of *gushing* inducing hydrophobins with beer foam proteins, 2014. 174p. PhD. Technische Universitat Munchen, 2014.

STRINGER, M. A.; TIMBERLAKE, W. E. *dewA* encodes a fungal hydrophobin component of the *Aspergillus* spore wall. **Molecular Microbiology**, v. 16, p. 33–44, 1995.

STUBNER, M.; LUTTERSCHMID, G.; VOGEL, R.F.; NIESSEN, L. Heterologous expression of the hydrophobin FcHyd5p from *Fusarium culmorum* in *Pichia pastoris* and evaluation of its surface activity and contribution to *gushing* of carbonated beverages. **International Journal of Food Microbiology**, v. 141, p. 110–115, 2010.

SUNDE, M.; KWAN, A.H.Y.; TEMPLETON, M.D.; BEEVER, R.E.; MACKAY, J.P. Structural analysis of hydrophobins. **Micron**, v. 39, p. 773–784, 2008.

SZILVAY, G.R.; NAKARI-SETALA, T.; LINDER, M.B. Behavior of *Trichoderma reesei* hydrophobins in solution: Interactions, dynamics, and multimer formation. **Biochemistry**, v. 45, p. 8590–8598, 2006.

SZILVAY, G.R.; PAANANEN, A.; LAURIKAINEN, K.; VUORIMAA, E.; LEMMETYINEN, H.; PELTONEN, J.; LINDER, M.B. Self-assembled hydrophobin protein films at the air-water interface: structural analysis and molecular engineering. **Biochemistry**, v. 46, p 2345-2354, 2007.

TALBOT, N.J.; EBBOLE, D.J.; HAMER, J.E. Identification and characterization of MPG1, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, v. 5, p. 1575–1590, 1993.

TORKKELI, M.; SERIMAA, R.; IKKALA, O.; LINDER, M. Aggregation and self-assembly of hydrophobins from *Trichoderma reesei*: Low-resolution structural models. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 2240–2247, 2002.

WANG, X.; GRAVELAND-BIKKER, J. F.; DE KRUIF, C. G.; ROBILLARD, G. T. Oligomerization of hydrophobin SC3 in solution: From soluble state to self-assembly. **Protein Science**, v. 13, p. 810–821, 2004.

WESSELS, J. G. H.; DE VRIES, O. M. H.; ASGEIRSDOTTIR, S. A.; SPRINGER, J.. The *thn* mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the SC3 hydrophobin gene. **Journal of General Microbiology**, v. 137, p. 2439–2445, 1991.

WILSON, S.M. A study of *gushing* in ciders: its mechanism and causative effect. Dissertation, University of Guelph, 1999, 168p.

WOSTEN, H. A. B. Hydrophobins: Multipurpose Proteins. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 625–646, 2001.

WOSTEN, H. A. B., VAN WETTER, M. A., LUGONES, L. G., VAN DER MEI, H. C., BUSSCHER, H. J., & WESSELS, J. G. H. How a fungus escapes the water to grow into the air. **Current Biology**, v. 9, p. 85–88, 1999.

XU, R. Light scattering: a review of particle characterization applications. **Particuology**, v. 18, p. 11–21, 2015.

ZAPF, M. W.; THEISEN, S.; VOGEL, R. F.; NIESSEN, L. (2006). Cloning of wheat LTP1500 and two *Fusarium culmorum* hydrophobins in *Saccharomyces cerevisiae* and assessment of their *gushing* inducing potential in experimental wort fermentation. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 112, p. 237–245, 2006.

## CAPÍTULO 4- Considerações Finais

A primeira parte do trabalho teve o intuito de monitorar o processo de três diferentes tipos de brassagem, analisando a conversão do amido presente no malte em açúcares e aminoácidos utilizando rampas de temperaturas para ativar as enzimas que fazem esta ação. Neste trabalho as análises padrões utilizadas foram eficientes para o monitoramento das três brassagens utilizadas. O teste de sacarificação do iodo utilizado para monitorar os processos em tempo real revelou que no momento em que a enzima  $\alpha$ -amilase começa a atuar ativamente no mosto a cor do iodo muda, pois esta enzima degrada o amido principalmente em dextrina, que são açúcares formados por grandes quantidades de glicose. Desta forma, quando o amido é convertido neste composto este é degradado rapidamente, porém o mosto ainda tem potencial para gerar mais açúcares, como a maltose que é o principal alimento das leveduras. Então, este teste não é suficiente para dizer que a etapa de sacarificação está completa. O °Brix mede o índice de açúcares presentes no mosto, para a primeira brassagem obteve-se 15,3 e para a segunda 15,0 indicando que são ideais para o processo de fabricação de cerveja do tipo Pilsen, já para a terceira brassagem obteve-se 14,3 que seria ideal para cervejas belgas, estas medidas são importantes pois são utilizadas para os cálculos da etapa de fermentação.

Com a cromatografia líquida de alta eficiência pode-se monitorar quatro açúcares principais que são gerados pelo processo de brassagem: glicose, frutose, maltose e dextrina. Dentre estes, a maltose e a dextrina são os mais relevantes. Ao término do processo a primeira brassagem teve maiores concentrações destes componentes (75,40  $\text{gL}^{-1}$  e 42,60  $\text{gL}^{-1}$ , respectivamente), as demais brassagem tiveram concentrações semelhantes, sendo 62,84  $\text{gL}^{-1}$  para maltose e 34,64  $\text{gL}^{-1}$  para dextrina na segunda brassagem, e 60,14  $\text{gL}^{-1}$  para maltose e 37,15  $\text{gL}^{-1}$  para dextrina na terceira brassagem. A glicose e frutose apresentaram baixas concentrações em todas as brassagens, sendo isso vantajoso, pois o mosto não pode conter níveis altos destes componentes porquê de acordo com o metabolismo das leveduras estas trabalham de forma ordenada para consumir os açúcares, e a frutose e glicose são os primeiros, se estes tiverem em altas concentrações as leveduras não consumirão a maltose.

Para as análises espectroscópicas dos processos foram utilizados: absorção no infravermelho médio, absorção no UV-Vis, índice de refração espectral, e fluorescência

de excitação e emissão. A absorção no infravermelho médio mostrou-se eficiente na caracterização dos açúcares presentes no mosto e na distinção das rampas de temperaturas de acordo com a produção destes açúcares pelas diferentes enzimas para cada tipo de brassagem. As análises revelaram principalmente os picos da maltose e dextrina, com os quais foi possível a diferenciação dos espectros durante os processos.

A absorção no ultravioleta-visível apresentou as bandas de absorção dos aminoácidos e da vitamina B2. Os aminoácidos são produtos da ação da enzima protease que é ativa nas primeiras rampas de temperatura, sendo um dos componentes essenciais para o processo de fermentação, pois é alimento das leveduras. Pela técnica de deconvolução foram identificadas três bandas centradas em 263, 279 e 311 nm, sendo utilizadas para a análise estatística discriminante. A estatística revelou a distinção das primeiras rampas de temperatura das demais em todas as brassagens, sendo para a primeira brassagem a de 45 e 55°C, para a segunda de 50°C. Desta forma, evidenciam a ação da enzima protease, sendo ativadas nas primeiras rampas de temperatura.

A técnica do índice de refração espectral mostrou que para a primeira brassagem as curvas foram crescentes acompanhando cada rampa de temperatura utilizada. Para segunda brassagem observa-se a distinção entre a primeira rampa e as demais, o mesmo ocorre para a terceira brassagem. Quando comparado com o °Brix, utilizando somente o comportamento no comprimento de onda de 589 nm, observa-se que ao longo do processo o comportamento é similar.

A técnica de fluorescência de excitação e emissão revelou o comportamento dos compostos aminoácidos, vitamina B e polifenóis presentes nos diferentes processos. Os aminoácidos possuem maior fluorescência que os demais compostos tendo emissão entre 345-570 nm quando excitado entre 260-310 nm. A vitamina B apresentou bandas entre 360-600 nm ao ser excitada entre 310-320 nm, e os polifenóis excitando em torno de 330 nm possui emissão em torno de 400 nm. O monitoramento dos aminoácidos e dos polifenóis são fundamentais para o processo de produção de cerveja, pois o primeiro tem que ter níveis controlados para ser utilizado no processo de fermentação, e o segundo não pode ter em excesso para não influenciar nas propriedades organolépticas características do produto final.

Todas as técnicas espectroscópicas utilizadas se mostraram eficientes tanto no monitoramento dos açúcares e aminoácidos, quanto para a caracterização das amostras revelando outros compostos presentes durante a brassagem. Para análise do monitoramento somente dos açúcares no mosto a técnica de absorção no infravermelho

médio se mostrou muito eficaz, e para monitoramento dos aminoácidos a técnica de absorção no UV-Vis é a mais indicada. Assim, principalmente as técnicas de absorção no infravermelho médio e absorção no UV-Vis podem ser utilizadas para análises em tempo real, sendo esta uma proposta promissora para trabalhos futuros, pois estas requerem pouca preparação de amostra e a quantidade utilizada é mínima.

A segunda parte do trabalho utilizou-se a técnica de espalhamento de luz dinâmica para detectar a nanoestruturas formadas pela interação da proteína hidrofobina e moléculas de CO<sub>2</sub> que são promovedoras do efeito *gushing* primário. Os estudos apresentados confirmam que os tamanhos destas nanoestruturas são menores conforme a pressão aumenta, tendo um diâmetro de aproximadamente 100 nm quando estão submetidos a pressão atmosférica, e quando a pressão aumenta para 4 atm o diâmetro encontrado é de aproximadamente 60 nm. Assim, com o sistema apresentado é possível detectar partículas relacionadas ao *gushing* em garrafas fechadas à alta pressão monitorando as partículas de 60 nm. Neste sistema fechado foram analisados a influência de diferentes concentrações de hidrofobinas, os resultados mostraram que a quantidades de *gushing* produzido é maior conforme aumenta a concentração destas proteínas, porém não ocorre influencia no tamanho das partículas, sendo detectados nanoestruturas de aproximadamente 60 nm em todos os casos. Desta forma, podemos confirmar as moléculas de CO<sub>2</sub> ao interagir com as monocamadas de hidrofobinas formam uma estrutura estável no líquido de aproximadamente 60 nm à 4 atm. Esse tamanho se torna uma fundamental característica sobre a interação hidrofobina-CO<sub>2</sub> à alta pressão. Ao inserir hidrofobinas em cervejas comerciais, ocorre interação entre a proteína e as moléculas de CO<sub>2</sub> presentes nas amostras. As amostras testadas com DLS apresentaram partículas com aproximadamente 60 nm, comprovando ser partículas característica do *gushing* primário.

Neste último trabalho, os resultados são promissores, porem necessitando de mais análises. Como o monitoramento da brassagem em diferentes tipos de processos utilizando o malte contaminado, podendo ser aplicado as diferentes técnicas espectroscópicas, apresentadas na primeira parte deste trabalho, para detectar previamente no processo de fabricação da cerveja este contaminante gerador do *gushing* primário.