

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO VEGETAL

ANA LUIZA ARRUDA

**POTENCIAL QUALITATIVO DE CERVEJAS ESTILO IPA ELABORADAS COM
LÚPULOS BRASILEIROS VS IMPORTADOS**

LAGES

2022

ANA LUIZA ARRUDA

**POTENCIAL QUALITATIVO DE CERVEJAS ESTILO IPA ELABORADAS COM
LÚPULOS BRASILEIROS VS IMPORTADOS**

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Leo Rufato

LAGES

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Arruda, Ana Luiza

Potencial qualitativo de cervejas estilo IPA elaboradas
com
lúpulos brasileiros vs importados / Ana Luiza Arruda. -- 2022.
157 p.

Orientador: Leo Rufato

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2022.

1. Humulus lupulus L. I. Rufato, Leo. II. Universidade do
Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção
Vegetal. III. Título.

ANA LUIZA ARRUDA

**POTENCIAL QUALITATIVO DE CERVEJAS ESTILO IPA ELABORADAS COM
LÚPULOS BRASILEIROS VS IMPORTADOS**

Tese de doutorado apresentado ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador:

Prof. Dr. Leo Rufato
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/Lages)

Membro Interno:

Profa. Dra. Francine Regianini Nerbass
Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/Lages)

Membros Externos:

Prof. Dr. Cristian Soldi
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC/Curitibanos)

Prof. Dr. Bruno Dalazen Machado
Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC/Lages)

Profa. Dra. Giliani Veloso Sartori
Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC/Urupema)

Lages, 2022

Dedico este trabalho aos meus pais,
com muito amor.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade e por me permitir concluir esta importante etapa na minha vida profissional.

Aos meus pais, Antonio e Margarete, por todo o suporte e incentivo, pelos bons ensinamentos de caráter, amor, compromisso e por terem contribuído de todas as formas possíveis para esta conquista.

Ao meu namorado Arlindo Junior, por todo carinho e compreensão ao longo deste período tornando essa jornada mais leve.

Ao meu orientador, Leo Rufato, pela confiança depositada, pelos ensinamentos repassados e pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional ao longo dos 10 anos que pertenci ao grupo de fruticultura.

À professora Daiana Petry Rufato por todo o auxílio nas análises estatísticas deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Enologia, em especial Adrielen, Cristiane, Deivid e Evelyn, que sempre estiveram à disposição para auxiliar no desenvolvimento deste trabalho.

À UFSC de Curitiba, que cedeu as dependências para realização das análises nos equipamentos CG-MS e HPLC. Ao professor Cristian Soldi, pela parceria fundamental e que com muito conhecimento, acreditou e auxiliou imensamente na execução deste trabalho.

À Empresa Brava Terra, pelo fornecimento de lúpulo produzido em sua fazenda no Estado de São Paulo, para utilização nos experimentos.

À Serena BrewShop e à Cervejaria Lajaika, em nome da Rosana e do Alex, pela parceria no desenvolvimento dos experimentos.

À Universidade do Estado de Santa Catarina e ao Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, pela oportunidade de realização deste curso gratuito e de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”.

Chico Xavier.

RESUMO

ARRUDA, A. L. Potencial qualitativo de cervejas estilo IPA elaboradas com lúpulos brasileiros vs importados. 2022. 157 p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2022.

A cerveja é o produto resultante da fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, oriundo de malte e água potável, por ação de leveduras com adição de lúpulo. Um dos grandes diferenciais das cervejas artesanais em relação às massificadas é a possibilidade de utilizar diferentes combinações de lúpulos e variações no processo produtivo, o que agrega na qualidade final da bebida elaborada. O lúpulo é uma importante ferramenta na elaboração de um produto com características únicas e, no Brasil, a maior parte da sua obtenção é feita por meio da importação. Porém, com o desenvolvimento acelerado das cervejarias artesanais, a cultura vem despertando interesse dos agricultores brasileiros. O objetivo deste projeto foi comparar e avaliar o potencial de utilização do lúpulo nacional vs importado na produção de cerveja artesanal do tipo *Indian Pale Ale* (IPA). O trabalho foi desenvolvido na Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV), Campus Lages. O primeiro capítulo compara a utilização do lúpulo “Comet” de origem nacional e importado e a concentração (0; 2; 4; 6 e 8 gramas/litro) utilizada para a produção de cervejas com o uso da técnica de *dry-hopping*. A adição de 8 gramas L⁻¹ de lúpulo brasileiro originou cervejas positivamente associadas com as variáveis atividade antioxidante, proteínas, amargor, compostos fenólicos totais, flavonoides, compostos voláteis (4-terpineol, geranato de metila, beta cariofileno e γ -cadineno) além de proporcionar a percepção de diferentes descritores aromáticos pelo painel sensorial, a exemplo de capim cidreira e eucalipto. Além disso, houve uma associação positiva das cervejas produzidas com lúpulo brasileiro, independente da concentração, com os compostos ácido sinápico, rutina e ácido p-cumárico e das cervejas produzidas com lúpulo importado com os compostos miricetina, ácido vanílico e ácido 3,4 dihidroxibenzoico. O segundo capítulo visa explorar a relação entre o conteúdo de alfa ácidos do lúpulo e as características químicas de cervejas elaboradas com dois cultivares peletizados (Comet e Fuggle) produzidos no Brasil e importado. Houve uma correlação inversa entre o teor de alfa ácidos e o conteúdo fenólico e capacidade antioxidante das cervejas. As cervejas em que foi utilizado lúpulo Fuggle brasileiro, com o menor teor de alfa ácidos dentre os avaliados, apresentaram maior associação positiva com o conteúdo de polifenóis totais e individuais e capacidade antioxidante. Em torno de 30 compostos voláteis foram identificados nas amostras de cervejas, os quais foram separados em quatro grupos. Houve uma associação positiva das cervejas produzidas com o lúpulo importado, em ambos os cultivares utilizados, com os seguintes grupos de compostos voláteis: álcoois, ésteres e cetonas. Observou-se uma associação positiva das cervejas produzidas com lúpulo Comet, em ambas as origens, com o grupo dos terpenos, indicando maiores teores desses compostos em comparação com a utilização do lúpulo Fuggle. Como conclusão, as cervejas

produzidas com o cultivar Fuggle Brasileiro possuem uma maior quantidade de compostos antioxidantes e os resultados confirmam que os cultivares e a origem influenciam no perfil aromático das cervejas produzidas. Por fim, no terceiro capítulo foram estudados três cultivares de lúpulo desidratado provenientes da região do Planalto Serrano de Santa Catarina (Cascade, Chinook e Columbus) na produção de cervejas ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida (0; 45; 90; 135 e 180 dias após o envase). A análise dos componentes principais elucida que a cerveja produzida com o cultivar Chinook está correlacionada positivamente com maioria das características avaliadas: compostos fenólicos totais, proteínas, flavonoides, pH e turbidez. Observou-se decréscimo significativo no teor de compostos fenólicos totais e flavonoides ao longo dos períodos de armazenamento para todas os cultivares analisados, entretanto, as cervejas produzidas com os cultivares Cascade e Columbus apresentaram maior estabilidade dessas características em comparação com a utilização do lúpulo Chinook.

Palavras-chave: *Humulus lupulus* L., *dry hopping*, compostos bioativos, compostos voláteis, compostos fenólicos

ABSTRACT

ARRUDA, A. L. Qualitative potential of IPA style beers made with brazilian vs imported hops. 2022. 157 p. Thesis (PhD in plant production) State University of Santa Catarina. Postgraduate Program in Plant Production, Lages, 2022.

Beer is the product resulting from the alcoholic fermentation of the brewer's wort, originating from malt and drinking water, by the action of yeasts with the addition of hops. One of the great differentials of craft beers in relation to massified beers is the possibility of using different combinations of hops and variations in the production process, which adds to the final quality of the elaborated beverage. Hops are an important tool in the elaboration of a product with unique characteristics and, in Brazil, most of the hops are obtained through importation. However, with the accelerated development of craft breweries, the culture has aroused the interest of Brazilian farmers. The objective of this study was to compare and evaluate the potential use of brazilian vs imported hop project in the production of Indian Pale Ale (IPA) craft beer. The work was developed at the University of the State of Santa Catarina (UDESC/CAV), Campus Lages. The first chapter deals with the study of the place where "Comet" hops are grown (Brazilian or imported) and the concentration (0; 2; 4; 6 and 8 grams/liter) used for the production of beers using the dry hopping technique. The addition of 8 grams L⁻¹ of Brazilian hops resulted in beers positively associated with the variables antioxidant activity, proteins, bitterness, total phenolic compounds, flavonoids, volatile compounds (4-terpineol, methyl geranate, beta caryophyllene and γ -cadinene) in addition to to provide the perception of different aromatic descriptors by the sensory panel, such as lemongrass and eucalyptus. In addition, there was a positive association of beers produced with Brazilian hops, regardless of concentration, with the compounds sinapic acid, rutin and p-coumaric acid and of beers produced with imported hops with the compounds myricetin, vanillic acid and 3,4-dihydroxybenzoic acid. The second chapter aims to explore the relationship between the alpha acid content of hops and the chemical characteristics of beers made with two pelleted cultivars (Comet and Fuggle) produced in Brazil and imported. There was an inverse correlation between the alpha acid content and the phenolic content and antioxidant capacity of the beers. The beers in which Brazilian Fuggle hops were used, with the lowest alpha acid content among those evaluated, showed a greater positive association with the content of total and individual polyphenols and antioxidant capacity. Around 30 volatile compounds were identified in the beer samples, which were separated into four groups. There was a positive association of beers produced with imported hops, in both cultivars used, with the following groups of volatile compounds: alcohols, esters and ketones. A positive association was observed between the beers produced with Comet hops, in both origins, with the terpene group, indicating higher levels of these compounds compared to the use of Fuggle hops. In conclusion, beers produced with the cultivar Fuggle Brasileiro have a greater amount of antioxidant compounds. The results confirm that the cultivars and their place of production influence the aromatic profile

of the beers produced. Finally, in the third chapter, three dehydrated hop cultivars from the Planalto Serrano region of Santa Catarina (Cascade, Chinook and Columbus) were studied in the production of beers over five storage periods of the beverage (0; 45; 90; 135 and 180 days after filling). The analysis of the principal components elucidates that the beer produced with the Chinook cultivar is positively correlated with most of the characteristics evaluated: total phenolic compounds, proteins, flavonoids, pH and turbidity. There was a significant decrease in the content of total phenolic compounds and flavonoids throughout the storage periods for all cultivars analyzed, however, the beers produced with the Cascade and Columbus cultivars showed greater stability of these characteristics compared to the use of Chinook hops.

Keywords: *Humulus lupulus* L., *dry hopping*, bioactive compounds, volatiles compounds, phenolics compounds

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferentes cervejas produzidas com a técnica de <i>dry hopping</i> através da variação da origem do lúpulo “Comet” e a concentração utilizada	38
Tabela 2. Compostos identificados nas amostras de cerveja usando microextração em fase sólida headspace e análise GC-MS.....	55
Tabela 3. Comprimento de onda, tempo de retenção, equação da reta, R ² , limite de detecção e limite de quantificação para os 19 compostos identificados na cerveja produzida com diferentes concentrações de lúpulo “Comet” durante a etapa de <i>dry hopping</i>	65
Tabela 4. Concentração (mg L ⁻¹) de compostos fenólicos em cervejas produzidas com diferentes locais de origem e concentrações de lúpulo no processo de <i>dry hopping</i>	70
Tabela 5. Diferentes cervejas produzidas através da variação da origem do lúpulo “Comet” e “Fuggle”	81
Tabela 6. Quantidade de alfa-ácidos em cada cultivar e origem de lúpulo determinados por espectrofotometria.	89
Tabela 7. Comprimento de onda, tempo de retenção, equação da reta, R ² , limite de detecção e limite de quantificação para os 18 compostos identificados na cerveja produzida com diferentes cultivares de lúpulo (Fuggle e Comet) provenientes de diferentes locais de cultivo (importado e brasileiro).	92
Tabela 8. Concentração (mg L ⁻¹) de compostos fenólicos em cervejas produzidas com diferentes cultivares e locais de origem.....	96
Tabela 9. Descrição dos tratamentos empregados para a realização do experimento.	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição do número de cervejarias por município no Brasil a partir de círculos proporcionais.....	25
Figura 2. Diferenças estruturais dos alfa-ácidos adhumulona, cohumulona e humulona.....	28
Figura 3. Mecanismo de isomerização dos alfa-ácidos do lúpulo.....	29
Figura 4. Estrutura dos beta-ácidos.....	29
Figura 5. Estrutura química dos principais óleos essenciais do lúpulo.....	30
Figura 6. Distribuição dos produtores de lúpulo por estado brasileiro.....	33
Figura 7. Fluxograma da produção de cerveja	34
Figura 8. Curva padrão de ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais.....	39
Figura 9. Curva padrão de quercetina para determinação dos flavonoides	40
Figura 10. Curva padrão de caseína para determinação de proteínas.....	41
Figura 11. Taça do tipo Floripa utilizada para a análise sensorial das cervejas	46
Figura 12. Análise dos componentes principais (ACP) para as variáveis: açúcares redutores; atividade antioxidante; compostos fenólicos totais; flavonoides; proteínas; amargor; acidez total; pH e teor alcoólico para as cervejas produzidas com a técnica de <i>dry hopping</i> utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.	49
Figura 13. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de cervejas produzidas com a técnica de <i>dry hopping</i> utilizando lúpulo brasileiro e importado em diferentes concentrações.....	51
Figura 14. Amargor de cervejas produzidas com a técnica de <i>dry hopping</i> utilizando lúpulo brasileiro e importado em diferentes concentrações.....	53
Figura 15. Análise dos componentes principais (ACP) para os compostos voláteis caracterizados via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em cervejas produzidas com a técnica de <i>dry hopping</i> utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.....	57
Figura 16. Áreas normalizadas para o composto beta pineno em cervejas produzidas com <i>dry hopping</i> utilizando diferentes concentrações e origens do lúpulo.....	60

Figura 17. Áreas normalizadas para os compostos Geraniol (A) e Acetato de Geraniol (B) em cervejas produzidas com <i>dry hopping</i> utilizando diferentes concentrações e origens do lúpulo.....	61
Figura 18. Áreas normalizadas para terpenos em cervejas produzidas com <i>dry hopping</i> utilizando diferentes concentrações e origens do lúpulo.	62
Figura 19. Análise dos componentes principais (ACP) para os compostos fenólicos caracterizados via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cervejas produzidas a técnica de <i>dry hopping</i> utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.	66
Figura 20. Cromatograma obtido por HPLC para o tratamento controle. Picos: ácido gálico, galocatequina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido elágico (vermelho = 255 nm); 2-(4-hidroxifenil)etanol, epicatequina (marrom = 280 nm); ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido sinápico (verde = 320 nm); rutina, miricetina (lilás = 360 nm).	71
Figura 21. Análise dos componentes principais (ACP) para as variáveis: amargor; acidez; álcool; corpo; estabilidade da espuma; consistência da espuma e carbonatação julgadas pelo painel sensorial em cervejas produzidas com a técnica de <i>dry hopping</i> utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.	74
Figura 22. Perfil aromático julgado pelo painel sensorial em cervejas produzidas com a técnica de <i>dry hopping</i> utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.	76
Figura 23. Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis: amargor; proteínas; acidez total; pH; atividade antioxidante; flavonoides; compostos fenólicos totais; açúcares redutores e cor utilizando lúpulo “Comet” ou “Fuggle” importado ou brasileiro na produção de cervejas.....	88
Figura 24. Correlação para as variáveis: amargor; alfa-ácidos; flavonoides; compostos fenólicos totais; atividade antioxidante e amargor em cervejas produzidas com dois cultivares de lúpulo provenientes de duas regiões.	90
Figura 25. Análise dos componentes principais (ACP) para os compostos fenólicos caracterizados via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cervejas produzidas com os lúpulos “Comet” e “Fuglle” importado ou brasileiro.....	93

Figura 26. Cromatograma obtido por HPLC para os tratamentos: Comet Importado (A – azul); Comet Brasileiro (A- vermelho); Fuggle Importado (B- azul); Fuggle Brasileiro (B – vermelho) no comprimento de onda 255 nm.....	97
Figura 27. Correlação para os compostos fenólicos: galocatequina (GA); catequina (CA); ácido 3,4-dihidroxibenzoico (A3,4); ácido vanílico (AV); ácido elágico (AE); 2-(4-hidroxifenil)etanol (2-4H); epicatequina (EPI); ácido cafeico (AC); ácido p-cumárico (ACP); ácido sinápico (AS); rutina (RUT) e alfa ácidos (AA) em cervejas produzidas com dois cultivares de lúpulo provenientes de duas regiões.....	98
Figura 28. Análise de componentes principais (PCA) para os grupos de compostos voláteis: álcoois, cetonas, ésteres e terpenos utilizando lúpulo “Comet” ou “Fuggle” importado ou brasileiro na produção de cervejas.....	100
Figura 29. Cromatogramas CG-MS das cervejas produzidas com o lúpulo Fuggle Brasileiro (A); Fuggle Importado (B); Comet Brasileiro (C) e Comet Importado (D).	103
Figura 30. Etapa de cozimento dos grãos (mosturação)	108
Figura 31. Panela automática para produção de cervejas em sistema single vessel.	109
Figura 32. Processo de conversão de amido em açúcares durante a mosturação através da realização do teste de iodo-amido.	109
Figura 33. Lúpulo em flor desidratado proveniente do Planalto Serrano de SC utilizado para a produção das cervejas.	110
Figura 34. Fermentador cônico em aço inox utilizado para a etapa de fermentação das cervejas.	111
Figura 35. Análise dos componentes principais (ACP) para as variáveis: turbidez; compostos fenólicos totais; flavonoides; proteínas; acidez total e pH para as cervejas produzidas com os cultivares Cascade, Columbus e Chinook.	115
Figura 36. Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/L) para três cultivares de lúpulo brasileiros na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.....	117
Figura 37. Percentual de redução de compostos fenólicos do primeiro ao último dia de avaliação para três cultivares de lúpulo brasileiro na produção de cervejas estilo IPA.....	118

Figura 38. Flavonoides (mg QE/L) para três cultivares de lúpulo produzidas no Brasil utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.	119
Figura 39. Percentual de redução de flavonoides em relação ao primeiro e ao último dia de avaliação para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA.	120
Figura 40. Proteínas (g caseína/L) para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.	121
Figura 41. Turbidez (NTU) para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor e em pellet na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.	122
Figura 42. pH para três cultivares brasileiras de lúpulo utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.	124
Figura 43. Acidez total (meq/L) para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor e em pellet na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.	125

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	20
2	HIPÓTESES	22
3	OBJETIVOS	22
3.1	GERAL	22
3.2	ESPECÍFICOS	22
4	REVISÃO DE LITERATURA	24
4.1	HISTÓRICO DA CERVEJA	24
4.2	MERCADO CERVEJEIRO	24
4.3	CERVEJA ARTESANAL	25
4.4	MATÉRIAS-PRIMAS	26
4.4.1	Água	26
4.4.2	Malte	26
4.4.3	Levedura	27
4.4.4	Lúpulo	27
4.5	IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO LÚPULO NO BRASIL	32
4.6	Processamento da Cerveja	33
5	ANÁLISE MULTIVARIADA PARA ESTUDAR AS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, SENSORIAIS E AROMÁTICAS DE CERVEJAS PRODUZIDAS COM A TÉCNICA DO <i>DRY HOPPING</i> UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E ORIGENS DO LÚPULO	35
5.1	RESUMO	35
5.2	INTRODUÇÃO	36
5.3	MATERIAL E MÉTODOS	37
5.3.1	Produção da Cerveja	37
5.3.2	Desgaseificação	39
5.3.3	Características químicas	39
5.3.4	Análise de Compostos Voláteis	43
5.3.5	Compostos fenólicos individuais	44
5.3.6	Análise Sensorial	45
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.4.1	Características físico-químicas	47
5.4.2	Perfil de compostos voláteis das cervejas em estudo	54
5.4.3	Perfil de compostos fenólicos das cervejas em estudo	63

5.4.4	Características Sensoriais	72
5.5	CONCLUSÕES	77
6	ANÁLISE MULTIVARIADA PARA ESTUDAR A RELAÇÃO ENTRE A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CERVEJAS E O CONTEÚDO DE ALFA-ÁCIDOS PRESENTE EM DOIS CULTIVARES DE <i>Humulus lupulus</i> L. E PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DAS BEBIDAS.....	78
6.1	RESUMO	78
6.2	INTRODUÇÃO	79
6.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	80
6.3.1	Processamento da cerveja artesanal.....	80
6.3.2	Alfa ácidos do lúpulo.....	81
6.3.3	Características químicas	82
6.3.4	Compostos Fenolicos Individuais	84
6.3.5	Análise de Compostos Voláteis	85
6.3.6	Análise dos Dados.....	86
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
6.4.1	Relação entre o teor de alfa ácidos do lúpulo e as características químicas da cerveja	87
6.4.2	Perfil de compostos voláteis	99
6.5	CONCLUSÕES	104
7	CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL PRODUZIDA COM LÚPULO BRASILEIRO E SEU DESEMPENHO NO TEMPO DE PRATELEIRA	105
7.1	RESUMO	105
7.2	INTRODUÇÃO	106
7.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	107
7.3.1	Processamento da cerveja artesanal.....	107
7.3.2	Matérias-primas.....	107
7.3.3	Mosturação.....	108
7.3.4	Separação dos grãos.....	109
7.3.5	Fervura	110
7.3.6	Resfriamento	111
7.3.7	Fermentação e Maturação.....	111
7.3.8	Limpeza das garrafas	112
7.3.9	Carbonatação	112
7.3.10	Análises físico-químicas	112

7.3.11	Análise Estatística	114
7.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
7.5	CONCLUSÕES	126
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	127
9	REFERÊNCIAS	128
10	APÊNDICES	142
11	ANEXOS.....	150

1 INTRODUÇÃO GERAL

No Brasil, a cerveja é definida e regulamentada pela Lei Federal no 8.918/14 e pelo decreto 6.817 de 2009, o qual foi recentemente revogado pelo 9.902 de 2019, sendo estabelecida como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, preparado com malte de cevada, água e lúpulo pela ação de leveduras (BRASIL, 2009).

Resultados obtidos em virtude do aumento de pesquisas sobre cerveja demonstram que o consumo da bebida traz benefícios significativos para a saúde (CHIVA-BLANCH *et al.*, 2014). Considerada uma bebida nutritiva, a cerveja apresenta em sua composição proteínas, carboidratos (glicose, maltose, frutose, etc.), sais minerais (cálcio, fósforo, potássio, magnésio, etc.) e vitaminas do complexo B (ALIYU; BALA, 2011).

O consumo de cervejas especiais é uma nova tendência que surge com o crescente interesse do consumidor em experimentar novos tipos da bebida. As cervejas artesanais tem como foco a elaboração de um produto de elevada qualidade, levando em consideração a peculiaridade dos seus ingredientes, o que resulta na produção de diversos tipos de cerveja que são minuciosamente elaborados conferindo melhor aroma e sabor à bebida (BREWERS ASSOCIATION, 2013).

Existem diversas maneiras de ajustar o processo de fabricação da bebida sendo que cada pequeno detalhe dá origem a uma cerveja diferente, por exemplo, é possível verificar um grande número de estilos que compõem o mercado de cervejas artesanais (BREWERS ASSOCIATION, 2019). Os diferentes estilos são baseados em diversos elementos como a origem dos ingredientes, maltes, leveduras e o tipo e quantidade de lúpulo utilizado (TORGALS, 2016).

O lúpulo (*Humulus lupulus* Linnaeus) pertence à ordem Rosales e à família Cannabaceae, é descrito como uma espécie dioica, perene e que apenas as flores femininas (também chamadas de cones) são utilizadas no processo cervejeiro devido a maior quantidade de lupulina presente (ALMAGUER *et al.*, 2014). Os cones são ricos em resinas (que conferem amargor), polifenóis (com propriedades antioxidantes) e óleos essenciais (que conferem aroma) (RETTBERG *et al.*, 2018).

Devido à sua grande importância para a indústria cervejeira, o lúpulo muitas vezes é chamado de “alma da cerveja”, pois, variando-se apenas o tipo e/ou a quantidade de lúpulo em uma mesma receita-base é possível dar origem à cervejas

totalmente distintas em termos de amargor e aroma (NACHEL; ETTLINGER, 2012; INUI *et al.*, 2013). Esta matéria-prima é normalmente comercializada e utilizada no processo de produção de cervejas na forma de pellets, extratos e produtos isomerizados (CARVALHO; GUIDO, 2022).

De acordo com as exigências climáticas para o cultivo de lúpulo (áreas produtoras situadas dentro das latitudes 35° e 55° Norte e Sul em função do maior fotoperíodo) acreditava-se que não era possível a sua produção no Brasil. Entretanto, existem algumas iniciativas para o cultivo desta planta em diversas cidades localizadas nas regiões Sul, Sudeste, Norte e Nordeste do país. Em 2014, no estado de São Paulo, foi noticiada a primeira produção de lúpulo em *terroir* brasileiro na região de Campos do Jordão e mais recentemente foi anunciado o cultivo de lúpulo em diversas cidades dos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo, Minas Gerais, Bahia e Brasília (CHAGAS; GARCIA, 2018).

Estas iniciativas de produção de lúpulo no Brasil têm gerado uma grande expectativa para que o país caminhe para a autossuficiência desta importante matéria-prima no processo de fabricação de cervejas, já que, o país é considerado o terceiro maior importador de lúpulo do planeta (cerca de 4 mil toneladas/ano com custos de 200 milhões de reais) (ARAÚJO, 2016).

A produção de lúpulo nacional tem um papel muito importante para a indústria cervejeira, já que por ter um período de estocagem e manuseio menor comparativamente ao lúpulo importado, conserva mais as resinas e os óleos essenciais, dando origem a um produto mais nobre além de proporcionar uma redução no custo de produção da cerveja em virtude da ausência das taxas de importação. Sendo assim, esse projeto visa esclarecer se o *terroir* brasileiro terá qualidade suficiente para a elaboração do produto final e ainda se o lúpulo nacional poderá ser amplamente utilizado na fabricação de cervejas.

2 HIPÓTESES

- 1) Diferentes cultivares de lúpulo em flor desidratada produzidos no Brasil conferem à cerveja distintas características químicas;
- 2) Há redução nas características químicas das cervejas com o aumento no período de estocagem do produto;
- 3) Há diferenças nas características químicas, voláteis e sensoriais das cervejas adicionadas de lúpulo Comet ou Fuggle nacional ou importado;
- 4) Quanto maiores as concentrações de lúpulo adicionadas durante o processo de dry hopping, melhores serão as características físico-químicas, voláteis e sensoriais da cerveja;
- 5) Há correlação entre o teor de alfa ácidos presentes no lúpulo e as características químicas e voláteis avaliadas na cerveja;

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto e efetividade da utilização de diferentes técnicas, cultivares e origens do lúpulo na produção de cervejas estilo IPA.

3.2 ESPECÍFICOS

- 1) Disponibilizar informações para a cadeia produtiva do lúpulo que viabilizem a competitividade da utilização do lúpulo brasileiro na produção de cervejas;
- 2) Determinar a efetividade da utilização de lúpulo na etapa fria da produção de cervejas artesanais estilo IPA, nas características químicas e sensoriais da bebida;

- 3) Avaliar as mudanças nas características químicas e sensoriais de cervejas artesanais estilo IPA de acordo com a elevação na concentração de lúpulo utilizado no dry hopping;
- 4) Mensurar o efeito que os diferentes cultivares e origens do lúpulo possam induzir nas características químicas de cervejas;
- 5) Avaliar se os cultivares de lúpulo produzidos no Brasil podem substituir os importados, resultando em ganhos em termos de características químicas e sensoriais das cervejas;
- 6) Identificar até que ponto a cerveja artesanal pode ser armazenada, sem que haja perdas significativas nas variáveis analisadas.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 HISTÓRICO DA CERVEJA

A cerveja é uma bebida alcoólica fermentada com uma história de 6000 a 8000 anos antes de Cristo, cujo processo de elaboração, cada vez mais regulado e controlado, permanece com os princípios básicos inalterados durante séculos (VENTURINI FILHO, 2010).

O lúpulo foi introduzido no processo de fabricação de cervejas somente na Idade Média quando se descobriu que esta planta além de proporcionar o amargor característico da bebida atuava como conservante natural (VENTURINI FILHO, 2010).

No Brasil, a cerveja foi introduzida no início do século XIX pela família real portuguesa (MORADO, 2017). O crescente interesse da população brasileira pela cerveja trouxe ao país diversos investidores estrangeiros e também abriu portas para que pequenas cervejarias pudessem trazer ao público o seu produto diferenciado (ROSALIN; GALLO, 2017).

4.2 MERCADO CERVEJEIRO

O Brasil é um dos principais produtores de cerveja do mundo, alcançando a terceira colocação, com aproximadamente 14 bilhões de litros anuais, o que corresponde a cerca de 1,6% do PIB do país (CERVBRASIL, 2020). Além disso, segundo o Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas (SEBRAE, 2017), o país é um dos maiores consumidores da bebida mundialmente, sendo que, a média de litros consumidos anualmente vem crescendo ano após ano.

Dados do Anuário da Cerveja no Brasil 2021, divulgados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mostram que o país possui quase 1550 microcervejarias registradas, o que representa um crescimento de aproximadamente 12% em relação ao ano anterior. Estes números confirmam a forte expansão do setor, através da ampliação do número de estabelecimentos e conseqüentemente de seus produtos. O aumento no número de cervejarias é justificado pela oportunidade de empreender em um negócio lucrativo em um mercado que demanda diversificação de produtos (MORADO, 2017).

A distribuição geográfica dos estabelecimentos se concentra mais nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, com destaque para as regiões metropolitanas das capitais, tais como Porto Alegre, Florianópolis, Curitiba, São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte, Brasília e Goiânia (ANUÁRIO DA CERVEJA, 2020). (Figura 1).

Figura 1. Distribuição do número de cervejarias por município no Brasil a partir de círculos proporcionais



Fonte: Anuário da Cerveja, 2021.

4.3 CERVEJA ARTESANAL

A cerveja é definida e regulamentada pela Lei Federal nº 8.918/14 e pelo decreto 6.817 de 2009, o qual foi recentemente revogado pelo 9.902 de 2019, sendo estabelecida como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, preparado com malte de cevada, água e lúpulo pela ação de leveduras (BRASIL, 2009). Segundo essa legislação, a bebida deve possuir uma proporção de malte de cevada de no mínimo 45% em peso, sobre o mosto cervejeiro, porém, a adição de outras matérias amiláceas (milho, arroz, trigo entre outros) pode modificar o sabor final do produto tornando a cerveja menos encorpada, o que não agrada alguns consumidores, embora reduza custos de produção em grandes cervejarias.

As cervejas artesanais são produzidas de maneira tradicional, por pequenas cervejarias e têm ganhado cada vez mais espaço no mercado, por trabalharem com cervejas “puro malte” em sua grande maioria (GAROFALO et al., 2015). Nesse contexto, as bebidas são produzidas geralmente com o malte de cevada puro,

matérias-primas nobres e maiores quantidades de lúpulo em suas receitas, o que garante características individualizadas e um sabor mais marcante.

Atualmente, o Ministério da Agricultura não faz distinção entre uma cervejaria grande e uma cervejaria artesanal, ou seja, não existe uma definição legal para registro de novos estabelecimentos, portanto as exigências são as mesmas.

4.4 MATÉRIAS-PRIMAS

4.4.1 Água

A água corresponde a cerca de 90% do volume final da cerveja e por isso tem muita importância na produção da bebida (TAYLOR, 2006). A água é utilizada não só para o processamento, como também para a limpeza das garrafas e da indústria, sendo que para esta, o volume gasto pode ser 4 a 10 vezes o volume de cerveja produzido (AQUARONE, 2001; VENTURINI FILHO, 2010).

Essa matéria-prima é responsável pela leveza, qualidade e confiabilidade da cerveja, sendo que, sua composição iônica permite a elaboração de variados estilos da bebida (BRUNELLI, 2012). De acordo com Morado (2017), os recursos tecnológicos permitem ajustar as propriedades da água de acordo com as necessidades e a formulação, podendo acentuar sabores maltados e de amargor pela alta concentração de sais de cálcio, magnésio e sulfato.

Os principais requisitos exigidos para se obter água cervejeira de qualidade são: ser potável, isenta de cloro, inodora e incolor, apresentar alcalinidade máxima de 50 ppm e concentrações de cálcio por volta de 50 ppm (AQUARONE, 2001; VENTURINI FILHO, 2010).

4.4.2 Malte

Para o processo de fabricação de cervejas o malte mais utilizado nas cervejarias é obtido a partir de cevada, sendo que, para que os grãos se transformem em malte é necessário que os mesmos sejam colocados sob condições favoráveis para germinação sem esquecer que esse processo deve ser interrompido em determinado período para que não ocorra a formação de uma nova planta (DRAGONE; SILVA, 2010). O processo de germinação controlada envolve as etapas de umidificação dos grãos, germinação e secagem e tem como objetivos: desenvolvimento de enzimas responsáveis pela quebra do amido durante a

brassagem e introduzir coloração e aromas desejáveis à cerveja (LIMA; FILHO, 2011).

De acordo com a Embrapa (2012) aproximadamente 75% da cevada que é produzida no Brasil é destinada para fabricação do malte, sendo que, 95% deste malte é designado para fins cervejeiros.

4.4.3 Levedura

As leveduras utilizadas na elaboração de cervejas pertencem ao gênero *Saccharomyces*, sendo responsáveis pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro, metabolizando os açúcares fermentescíveis para produzir álcool, gás carbônico, energia na forma de ATP e calor (CURI, 2006).

As cepas cervejeiras são divididas em duas categorias, de acordo com algumas características que as diferenciam: são as leveduras do tipo Ale e as leveduras do tipo Lager (BOKULICH & BAMFORTH, 2013). A cerveja *Lager* é produzida por leveduras de baixa fermentação (cuja temperatura ótima de atuação é entre 7-15°C) têm a capacidade de flocular no final da fermentação, sendo coletadas na base do fermentador, enquanto que, para elaboração de cervejas do tipo *Ale* são utilizadas leveduras de alta fermentação (cuja temperatura ótima de atuação é entre 18-22°C) que se concentram na parte superior do fermentador (AQUARONE, 2001; VENTURINI FILHO, 2010).

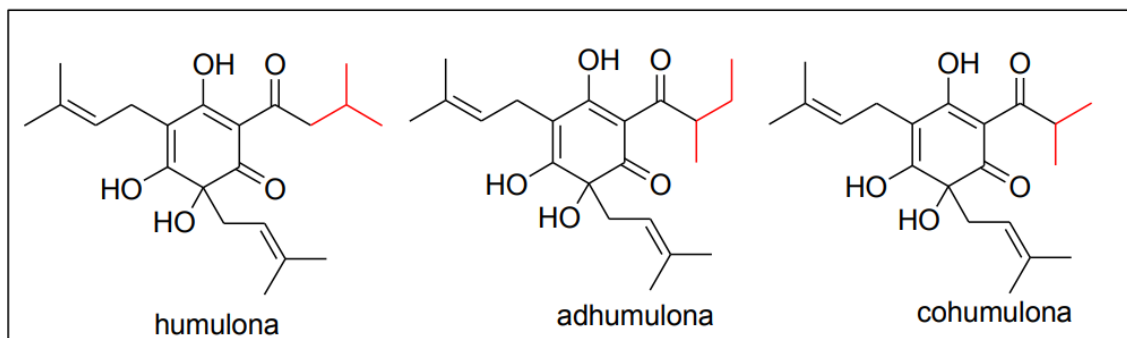
4.4.4 Lúpulo

Humulus lupulus Linnaeus é o nome científico da espécie pertencente à ordem das Rosales e à família Cannabaceae (ALMAGUER et al., 2014). As flores femininas do lúpulo, também conhecidas como cones, são adicionadas no processamento da cerveja para conferir amargor, sabor e aroma, pois contém resinas e óleos essenciais (HUGUES, 2014; KUNZE, 2006). Outra característica importante do lúpulo é a sua ação antisséptica (PREEDY, 2009).

Somente as flores fertilizadas das plantas fêmeas de lúpulo são de interesse para a indústria cervejeira, visto que, apenas nelas são encontradas as glândulas de lupulina, responsáveis pela secreção de um pó amarelo que contém as substâncias químicas de interesse, ou seja, resinas, óleos essenciais e polifenóis (WANNENMACHER et al., 2018; TING; RYDER, 2018).

Os alfa-ácidos, também conhecidos como humulonas, são uma classe de moléculas insolúveis em água e que se diferenciam pelas suas cadeias laterais, sendo adhumulona, cohumulona e humulona os três principais análogos (DOSTÁLEK; KARABÍN; JELÍNEK, 2017) (Figura 2).

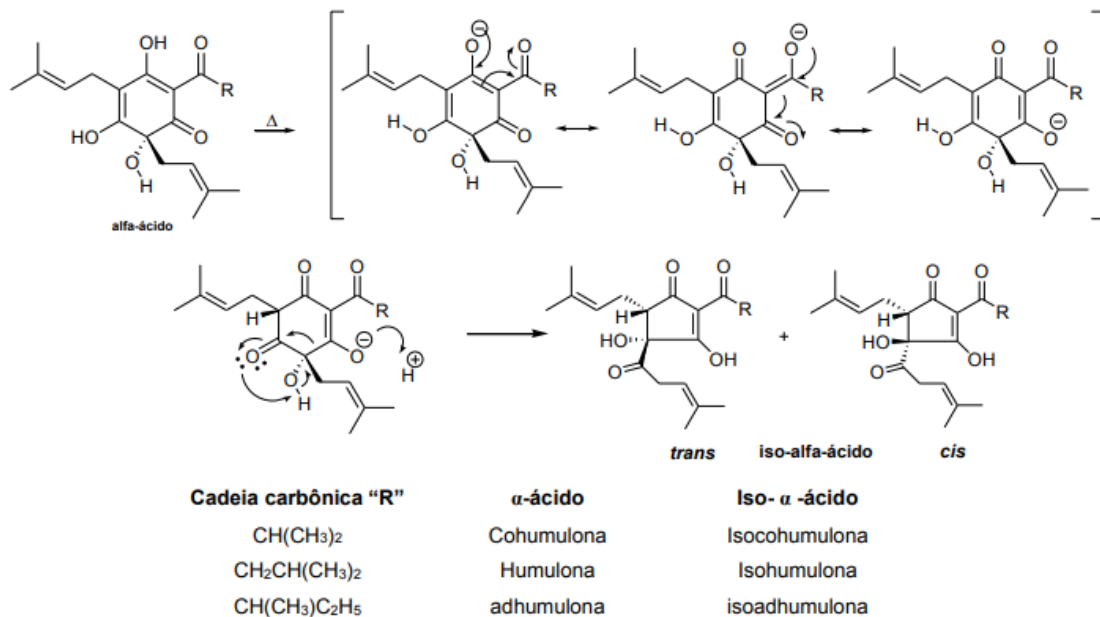
Figura 2. Diferenças estruturais dos alfa-ácidos adhumulona, cohumulona e humulona.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Quando em elevadas temperaturas (70-120°C), os alfa-ácidos isomerizam-se a iso-alfa-ácidos por um tipo de contração no anel, tornam-se solúveis e por esse motivo, no processo de produção das cervejas, para conferir amargor a bebida adiciona-se o lúpulo durante a fervura do mosto (STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015) (Figura 3). Além de fornecer amargor típico da bebida, os iso-alfa-ácidos possuem propriedades tensioativas, aumentando o tempo de retenção da espuma, e inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas, promovendo o poder bacteriostático da flor (ZUFALL et al., 2008; CATOOR et al., 2013; STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015).

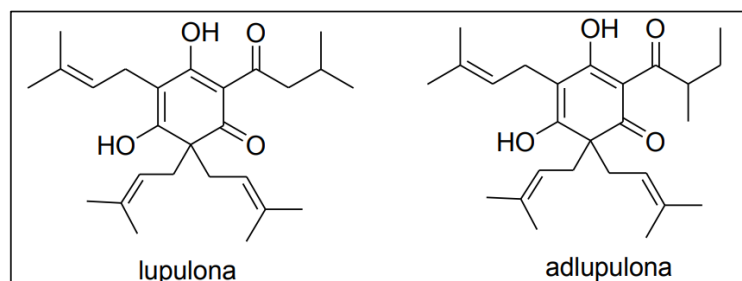
Figura 3. Mecanismo de isomerização dos alfa-ácidos do lúpulo



Fonte: Adaptado de Jaskula et al. (2008).

Os beta-ácidos, também denominados de lupulonas, são outra classe de compostos insolúveis em água (DOSTÁLEK; KARABÍN; JELÍNEK, 2017) (Figura 4). Ao contrário dos α -ácidos, eles não sofrem isomerização ao longo da fervura do mosto, portanto, eles não contribuem para o amargor final da cerveja (ALMAGUER et al., 2014). Os beta-ácidos tem um valor menor na aplicação do processo cervejeiro, contudo, possuem uma alta atividade antimicrobiana a qual é importante para a morte dos microrganismos na estocagem da cerveja (PINTO, 2018).

Figura 4. Estrutura dos beta-ácidos

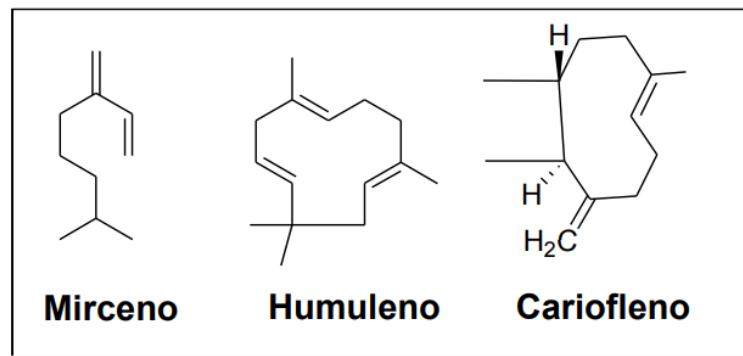


Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Os óleos essenciais são sintetizados nos tricomas das glândulas de lupulina e são compostos por moléculas voláteis responsáveis pelo aroma, dentre os quais destacam-se o mirceno, humuleno e cariofileno, cujas estruturas estão

representadas na Figura 5 (RETTBERG; BIENDL; GARBE, 2018; HOLT *et al.*, 2019). Os principais aromas associados a lúpulos são cítricos, esterificados, florais, herbais, e terrosos (TING; RYDER, 2018). A maior parte dos óleos essenciais são perdidos ao longo da etapa de fervura, e são encontrados somente traços destes compostos no produto final (ALMAGUER *et al.*, 2014).

Figura 5. Estrutura química dos principais óleos essenciais do lúpulo



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Os polifenóis fazem parte do metabolismo secundário do lúpulo e representa cerca de 4% do peso seco do cone (PINTO, 2018). Possuem ação antioxidante, o que auxilia na manutenção das características sensoriais do produto final, sendo também, importantes para a saúde (KARABIN *et al.*, 2016).

Durello (2019) avaliou os detalhes moleculares de lúpulos cultivados no Brasil no processo cervejeiro e através dos resultados encontrados na pesquisa concluiu que de 10 amostras de lúpulo avaliadas, apenas uma, a variedade Cascade produzida no estado de Minas Gerais, apresentou teores de óleos essenciais e ácidos amargos semelhantes ao descrito na literatura e foi então, utilizado para fabricação de uma cerveja artesanal. O mesmo autor indica que a variedade de lúpulo Cascade produzida no Brasil pode ser utilizada para a fabricação de cervejas e que quando comparado os perfis voláteis das cervejas produzidas com lúpulo nacional e importado estes apresentaram diferenças, o que sugere que o lúpulo brasileiro pode conferir aromas e sabores diferenciados.

Há 48 variedades de lúpulo registradas no Brasil, entretanto, as mais cultivadas são: Cascade, Columbus, Chinook, Nugget, Saaz, Centennial, Comet, Hallertau Mittelfrueh e Magnum (IICA, 2021).

4.4.4.1 Cultivares de lúpulo avaliadas na produção de cervejas

Chinook

Cultivar criado a partir de um cruzamento entre Petham Golding e uma planta macho selecionado pelo USDA, possui elevados teores de alfa ácidos e pode ser utilizado como lúpulo de amargor em praticamente todas as cervejas, principalmente nas IPAS (HOPGUIDE, 2022). Contém 10,0 a 14,0% de alfa ácidos e 3,5 a 4,5% de beta ácidos. Potencial produtivo 1.600 a 2.000 kg/ha e 1,5 a 2,7 ml/100g de óleos essenciais (WOODSKE, 2012).

Cascade

Lúpulo aromático com maior popularidade nos Estados Unidos, originado de um cruzamento entre os cultivares Fuggle e Serebrianka (HOPGUIDE, 2022). Contém de 4,5 a 7,0% de alfa ácidos, 4,5 a 7,0% de beta ácidos, 0,7 a 1,5 ml/100g de óleos essenciais, e possui potencial produtivo de 1.600-2.200 kg/ha de cones secos (WOODSKE, 2012).

Columbus

Originalmente selecionado por Charles Zimmermam, Columbus é um descendente da cultivar Nugget. É um cultivar de amargor americano com altos rendimentos em termos de alfa ácidos (HOPGUIDE, 2022). Contém de 15,0 a 17,0% de alfa ácido e 4,5 a 5,0% de beta ácidos, 1,5 a 2,0 ml/100g de óleos essenciais e potencial produtivo 2.900-3.000 kg/ha de cones secos (WOODSKE, 2012).

Fuggle

Lúpulo aromático, inglês, de caráter suave. Muito adequado para realização do *dry-hopping* de cervejas estilo IPA. Este lúpulo robusto contribui com todas as características essenciais de sabor, aroma e amargor fornecendo equilíbrio para a bebida. Comparável aos Goldings da Estíria eslovena. Contém de 4,0 a 5,50% de alfa ácido e 2,1 a 2,8% de beta ácidos, 0,44 a 0,83 ml/100g de óleos essenciais (HOPGUIDE, 2022).

Comet

É um cultivar de duplo propósito, originado de um cruzamento do lúpulo Sunshine e uma variedade americana selvagem em 1961 na Universidade do Oregon, lançado pela primeira vez em 1974. Contém de 6,0 a 12,0% de alfa ácido e 3,0 a 6,1% de beta ácidos, 1,4 a 3,3 ml/100g de óleos essenciais (WOODSKE, 2012).

4.5 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO LÚPULO NO BRASIL

A maior parte do lúpulo utilizado no Brasil é importado e de acordo com dados divulgados pela Secretaria de Comércio Exterior do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços, foram 4271 toneladas de lúpulo importadas em 2021 a um custo de 82 milhões de dólares, o que representou um aumento superior a 40% em volume e valor gasto com o lúpulo no mercado externo, se comparado a 2020.

O surgimento de micro e pequenas cervejarias, além da criação da Associação Brasileira de Produtores de Lúpulo (APROLÚPULO) no ano de 2018, estimulou o cultivo do lúpulo em diferentes regiões do país. De acordo com a Aprolúpulo, há um total de 127 associados distribuídos conforme exemplificado na Figura 6. As cervejarias locais têm grande interesse nos potenciais novos aromas e sabores provenientes do *terroir* brasileiro e nos preços potencialmente mais baratos.

Figura 6. Distribuição dos produtores de lúpulo por estado brasileiro.



Fonte: Aprodúpulo, 2021.

4.6 PROCESSAMENTO DA CERVEJA

De acordo com Eblinger e Narzib (2012) a produção de cervejas a partir do malte ou de uma mistura de malte e outras matérias-primas, com ajuda da água, lúpulo e levedura, divide-se basicamente em duas partes:

- a. Obtenção de um líquido rico em açúcares (mosto);
- b. Fermentação do mosto pelas leveduras.

Ainda de acordo com este autor, o processo de obtenção do mosto é dividido em algumas etapas:

- a. Moagem do malte e dos adjuntos;
- b. Produção de um extrato açucarado (mosto) através de um processo conhecido como mostura, que consiste no cozimento do malte em água e hidrólise do amido pelas enzimas presentes no malte seguindo uma

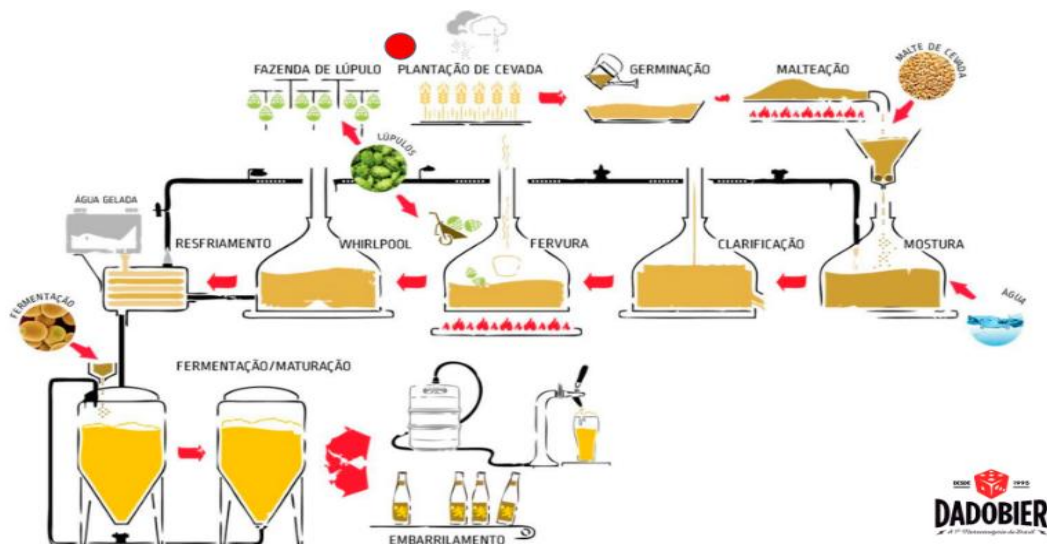
- determinada curva de temperatura. Os açúcares gerados são utilizados pelas leveduras no processo fermentativo (SIQUEIRA et al., 2008);
- Separação do mosto e das sobras do malte, casca e substâncias insolúveis através de uma filtração e clarificação;
 - Fervura do mosto, para esterilização e inativação de enzimas e adição de lúpulo, responsável pelo sabor e aroma da cerveja (BARTH, 2013);
 - Resfriamento rápido do mosto para evitar a contaminação alcançando uma temperatura adequada para inoculação das leveduras sem comprometimento na viabilidade de células.

O processo de fermentação pode ser dividido em três etapas:

- Fermentação primária;
- Fermentação secundária e maturação da cerveja (em tanques fechados);
- Filtração e envase da cerveja em barris ou garrafas.

O fluxograma da produção de cervejas pode ser verificado através da Figura 7.

Figura 7. Fluxograma da produção de cerveja



Fonte: DadoBier, 2021.

5 ANÁLISE MULTIVARIADA PARA ESTUDAR AS CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS, SENSORIAIS E AROMÁTICAS DE CERVEJAS PRODUZIDAS COM A TÉCNICA DO *DRY HOPPING* UTILIZANDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E ORIGENS DO LÚPULO

5.1 RESUMO

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é uma planta cuja inflorescência feminina é utilizada na indústria cervejeira para conferir amargor e aroma à bebida, sendo que, o Brasil importa cerca de 98% desta matéria-prima. Entretanto, essa planta vem ganhando destaque no país influenciando diretamente na qualidade aromática e no sabor do produto final. O consumidor brasileiro vem mudando o hábito de consumo de cervejas dando preferência àquelas que utilizam técnicas que evidenciam o aroma e o sabor lupulado da bebida. Este estudo objetivou analisar a origem do lúpulo e a concentração utilizada na produção de cervejas com o uso da técnica do dry-hopping. O trabalho foi desenvolvido na UDESC/CAV, em Lages/SC, no ano de 2021. Uma cerveja padrão do estilo *Indian Pale Ale*, com a mesma receita base, foi produzida e separada em nove fermentadores. Os tratamentos foram definidos durante a etapa de maturação, onde cada fermentador maturou sob diferentes concentrações (0; 2; 4; 6 e 8 g L⁻¹) e origens (nacional e importado) do lúpulo “Comet” peletizado durante 7 dias. As cervejas foram analisadas em triplicata quanto aos seus aspectos físico-químicos, sensoriais e aromáticos. A análise de compostos fenólicos individuais se constituiu uma exceção e foi realizada nas cervejas produzidas até a concentração de 6 g L⁻¹ em ambas as origens. Para auxiliar na interpretação dos dados, a análise de componentes principais foi utilizada. A adição de 8 gramas L⁻¹ de lúpulo brasileiro originou cervejas positivamente associadas com as variáveis atividade antioxidante, proteínas, amargor, compostos fenólicos totais e flavonoides. Foram identificados 43 compostos voláteis nas cervejas, e da mesma forma que para as características anteriormente citadas, as cervejas produzidas com a adição da maior quantidade de lúpulo brasileiro (8 gramas L⁻¹), associaram-se de forma positiva com os compostos voláteis 4-terpineol, geranato de metila, beta cariofileno e γ -cadineno os quais são conhecidos como metabólitos secundários derivados do lúpulo. Dentre os 18 compostos fenólicos analisados, 12 foram identificados em pelo menos uma amostra de cerveja. Houve uma associação

positiva das cervejas produzidas com lúpulo brasileiro, independente da concentração, com os compostos ácido sinápico, rutina e ácido p-cumárico. Os compostos miricetina, ácido vanílico e ácido 3,4 dihidroxibenzoico apresentaram correlação positiva com as cervejas adicionadas de lúpulo importado. O tratamento em que não foi utilizado o *dry hopping* apresentou os menores valores de galocatequina, epicatequina, 2-(4-hidroxifeniletanol) e ácido cafeico. A utilização de 8 g L⁻¹ brasileiro permitiu a percepção de diferentes descritores aromáticos pelo painel sensorial, a exemplo de capim cidreira e eucalipto. Conclui-se que o lúpulo nacional apresentou qualidade superior para ser utilizado na produção de cervejas através da adição de 8 g L⁻¹ no *dry hopping*.

Palavras-Chave: *Humulus lupulus* L., compostos voláteis, compostos fenólicos.

5.2 INTRODUÇÃO

O *Humulus lupulus* L., conhecido como lúpulo, é uma espécie perene, dióica, pertencente à ordem das Rosales e a família Cannabaceae (ALMAGUER et al., 2014). Na cerveja, é usado para conferir amargor, sabor e aroma além de possuir propriedades bacteriostáticas (PADGITT-COBB et al., 2021). A produção comercial de lúpulo é focada na planta feminina, pois a masculina não apresenta os compostos de interesse em quantidades satisfatórias, servindo apenas para o melhoramento genético (CERENAK et al., 2019).

Os principais países produtores estão localizados no Hemisfério Norte, devido à ocorrência natural das plantas e fatores climáticos favoráveis, como o fotoperíodo, que proporciona melhores condições de desenvolvimento para a cultura (BAUERLE, 2019). O Brasil importa praticamente 100% do lúpulo utilizado (cerca de 3,2 mil toneladas anuais a um custo de US\$ 56 milhões) (COMEX, 2021). Entretanto, o cultivo de lúpulo no país está em expansão, impulsionado pelo aumento no número de cervejarias, e já conta com 48 cultivares no Registro Nacional de Cultivares e área plantada de 50 hectares com produção estimada em 20 toneladas (APROLÚPULO, 2021; RNC, 2021). A produção de lúpulo brasileiro possui um papel fundamental para a indústria cervejeira e influencia diretamente a qualidade aromática e gustativa do produto final, já que seu período de estocagem é menor, o

que preserve mais os compostos desejáveis para a produção de cervejas, dando origem a um produto mais nobre (PINTO, 2018).

O lúpulo pode ser adicionado durante várias etapas na produção de cervejas, sendo que, cada ponto de adição confere à bebida distintas características de amargor e de aroma (TITUS *et al.*, 2021). Quando o lúpulo é adicionado durante a fervura do mosto, confere amargor à cerveja já que os compostos aromáticos evaporam em função das altas temperaturas e do tempo de exposição (PRAET *et al.*, 2015). Com o objetivo de permitir a maximização de aromas lupulados à cerveja, a técnica de *dry-hopping* pode ser empregada. Neste processo, o lúpulo é adicionado à bebida nos últimos dias da fermentação ou durante a etapa de maturação permitindo maior qualidade aromática já que as temperaturas mais baixas retêm os óleos voláteis de maneira mais eficaz (HIERONYMUS, 2012).

O objetivo deste trabalho foi avaliar de forma multivariada o impacto químico e sensorial das concentrações (0; 2; 4; 6 e 8 g/L) e origens (Brasil e Estados Unidos) do lúpulo “Comet” utilizado no *dry hopping* em cervejas do tipo *Indian Pale Ale*.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Produção da Cerveja

O experimento foi realizado no Núcleo de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV), em Lages/SC no ano de 2021.

As cervejas foram produzidas em painéis automáticas em aço inox 304 com capacidade total de 30 litros cada uma, em sistema Single Vessel, que possibilita a brassagem e a fervura do mosto em um único equipamento. No total, foram produzidos 90 litros de cerveja (30 litros em cada panela) através da mistura de 7,5 kg de malte *Pale* com 24 litros de água em cada um dos equipamentos, sob temperatura controlada de 67°C. A mistura foi mantida em cozimento durante 60 minutos, e após, o mosto foi aquecido a 76°C durante 10 minutos na etapa de *mash-out*. Em seguida, os grãos de malte foram separados do mosto líquido e foi realizado a lavagem dos grãos com 20 litros de água a 76°C. Após, o mosto foi fervido durante 60 minutos, onde foi realizada a adição do lúpulo Chinook (importado) no início (38g), na metade (23g) e no final da fervura (23g) (60, 30 e 5 minutos respectivamente) para atingir as unidades de amargor desejadas na receita. Em

seguida, o mosto foi resfriado com um trocador de calor denominado *chiller* de imersão até atingir uma temperatura final de 24°C. O mosto foi dividido em 9 fermentadores cônicos de aço inox, totalizando 10 litros em cada um dos equipamentos, e foi colocado para fermentar em uma sala acondicionada a 18°C durante 7 dias, utilizando a levedura Fermentis US-05 em uma concentração de 0,6 g/L. Em seguida, os fermentadores foram transferidos para câmara fria a 0°C para que se desse início à etapa de maturação. Após 12 horas em câmara fria, foi realizado o processo de *dry hopping*, onde os tratamentos foram divididos de acordo com a origem do lúpulo Comet e a concentração escolhida.

O lúpulo selecionado para realização do *dry hopping* foi do cultivar Comet disponibilizado pela empresa Brava Terra Lúpulo, localizada na cidade de Fartura/SP, safra 2021, com teor de alfa ácidos e óleos essenciais de 10,5% e 2,4 mL/100 g . O mesmo cultivar foi adquirido em um BrewShop e era proveniente dos Estados Unidos, safra 2020, com teor de alfa ácidos e óleos essenciais de 9,5%, e 2,5 mL/100 g, respectivamente. Os tratamentos estão expressos na Tabela 1. Todas as cervejas foram maturadas de acordo com os tratamentos por um período de 7 dias a 0°C.

Tabela 1. Diferentes cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* através da variação da origem do lúpulo “Comet” e a concentração utilizada

Código da amostra	Origem	(g/L)
Branco	-	0
Bra2	Brasileiro	2
Bra4	Brasileiro	4
Bra6	Brasileiro	6
Bra8	Brasileiro	8
Imp2	Importado	2
Imp4	Importado	4
Imp6	Importado	6
Imp8	Importado	8

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.3.2 Desgaseificação

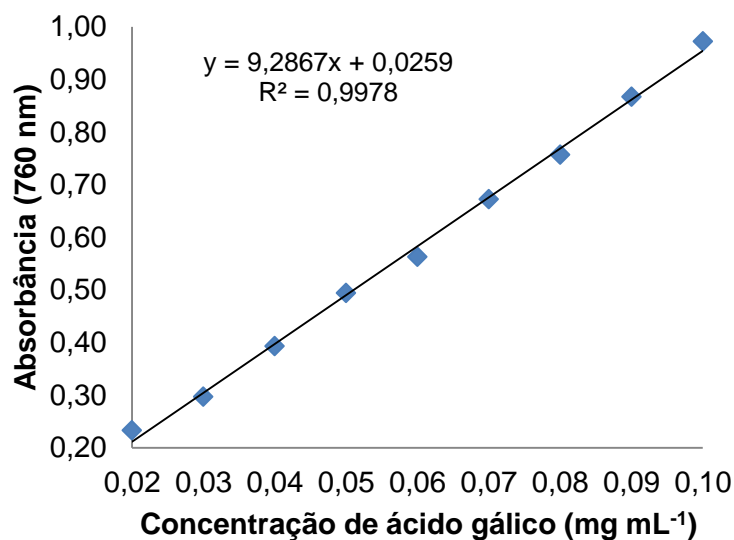
Antes da realização das análises, as amostras foram colocadas em tubos de ensaio durante 30 minutos em um aparelho de ultra-som com o objetivo de desgaseificá-las.

5.3.3 Características químicas

a) Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Singleton & Rossi (1965) com modificações realizadas por Zhao et al. (2010). Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, a 0,5 mL da amostra de cerveja diluída (1:20), adicionou-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de Na_2CO_3 a 7,5%. O tubo de ensaio foi incubado por 5 min em Banho-Maria a 50°C. Após 15 minutos de repouso, o complexo azul formado foi quantificado em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 760 nm. A medição foi então comparada com uma curva padrão de ácido gálico (Figura 8) e o resultado expresso em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por litro de cerveja (mg GAE L^{-1}).

Figura 8. Curva padrão de ácido gálico para determinação dos compostos fenólicos totais

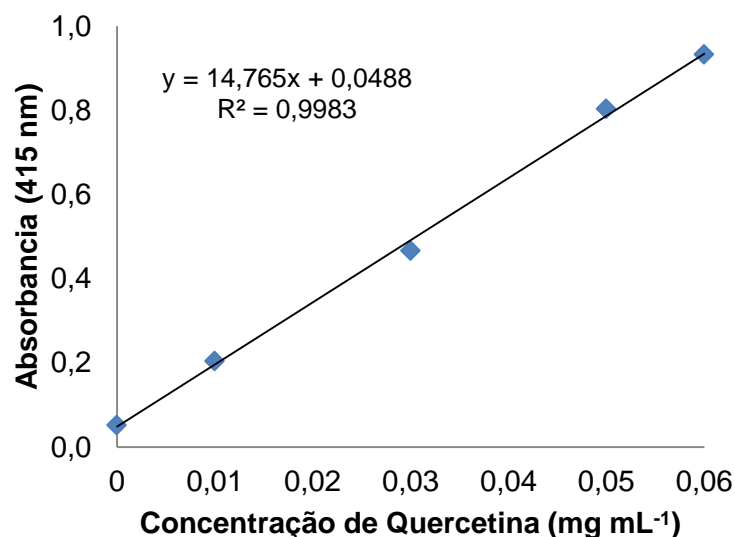


Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

b) Flavonoides

Os flavonoides foram determinados de acordo com a metodologia proposta por MEDA *et al.*, 2005, com adaptações. A determinação foi realizada por espectrofotometria, com leitura realizada na faixa de absorvância de 415 nm. Em tubos de ensaio, colocou-se 2 mL da amostra diluída (1:1) e acrescentou-se 2 mL de cloreto de alumínio à 2% em metanol. Após 30 minutos de repouso, as leituras foram realizadas. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração usando o padrão quercetina (Figura 9) e os resultados foram expressos em mg de quercetina por litro de cerveja (mg QE L^{-1}).

Figura 9. Curva padrão de quercetina para determinação dos flavonoides



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

c) Atividade Antioxidante

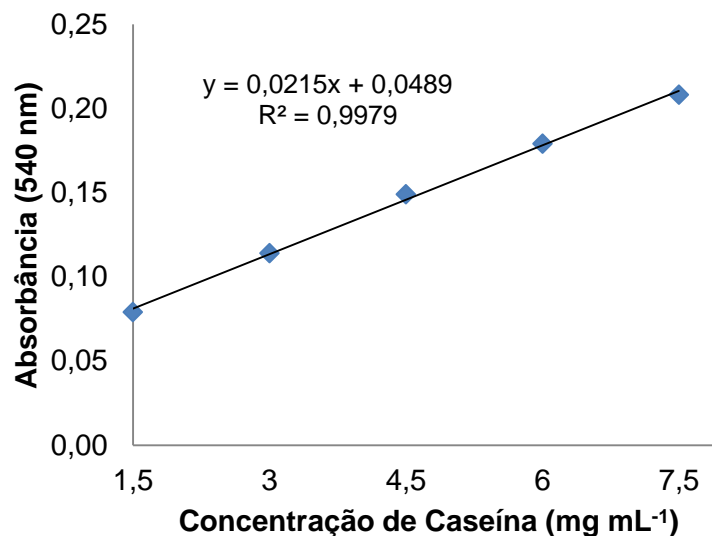
A atividade antioxidante das cervejas foi determinada pela metodologia baseada na determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro - FRAP (RUFINO *et al.*, 2006). O reagente FRAP foi preparado no dia da análise e utilizado imediatamente, através da mistura de 25 mL do tampão de acetato (0,3 M), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de uma solução de cloreto de ferro (20 mM). Para tubos de ensaio foi transferida uma alíquota de 0,09 mL da bebida, 2,7 mL do reagente FRAP e 2,7 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e os tubos mantidos em banho maria à 37°C durante 30 minutos. Após, a absorvância foi

quantificada no comprimento de onda de 595 nm, onde foi utilizado o reagente FRAP para calibração do espectrofotômetro. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração usando o padrão Trolox e os resultados foram expressos em mg de Trolox por litro de cerveja (mg Trolox L^{-1}).

d) Proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada baseada na metodologia proposta por Gornall *et al.*, (1949). Foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL da amostra de cerveja (diluição de 1:1) e 5 mL do reagente de biureto (1,5 g de sulfato de cobre + 6g de tartarato duplo de sódio e potássio dissolvidos em 500 mL de água destilada. Após, juntar, sob agitação, 300 mL de NaOH 10% e completar a 1 litro). Agitou-se os tubos com auxílio de um vórtex de bancada e em seguida os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos. Logo após, realizou-se a leitura no comprimento de onda de 540 nm. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração usando o padrão caseína (Figura 10) e os resultados foram expressos em mg de caseína por litro de cerveja (mg QE L^{-1}).

Figura 10. Curva padrão de caseína para determinação de proteínas



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

e) Teor alcoólico

100 mL da amostra previamente descarbonatada adicionada de 50 mL de água destilada foi transferida para um conjunto de destilação. O destilado foi recolhido em um balão volumétrico de 100 mL e a graduação alcoólica das cervejas foi determinada com a utilização de um alcoômetro com leitura direta à 20 °C.

f) pH

O pH foi determinado pelo método eletrométrico utilizando um pHmetro de bancada (calibrado com as soluções padrão antes do uso), sendo medido em amostras de 10 ml de cerveja (EBC, 2005).

g) Acidez Total

Foi determinada pelo método de titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 N (padronizada com biftalato de potássio), utilizando-se como indicador solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Foram pipetados 5 mL de amostra e 5 mL de água destilada em um béquer e titulado a solução de hidróxido de sódio até o ponto de viragem (EBC, 2005).

A acidez total foi expressa em meq L⁻¹, de acordo com a equação (1): Acidez Total (meq L⁻¹) = (1000 x n x NNaOH)/v, onde: n = volume da solução de NaOH gasto na titulação (mL); N = Normalidade da solução de NaOH; v = Volume da amostra (mL).

h) Sólidos Solúveis Totais

Os sólidos solúveis totais foram quantificados através de leitura direta em refratômetro portátil digital, previamente calibrado com água destilada, com valor corrigido a 20°C e os resultados expressos em °Brix (EBC, 2005).

i) Açúcares Redutores

A metodologia utilizada para determinar a quantidade de açúcares redutores é descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Pipetou-se 5 mL da amostra degaseificada para um balão volumétrico de 100 mL e completou-o com a solução de *Fehling*. Levou-se a amostra à fervura e titulou-se, gota a gota, a amostra contida na bureta para o erlenmeyer. Ao início da titulação, observou-se uma cor azul

intensa que ao mudar de coloração foi acrescentado uma gota de azul de metileno (1%) e continuou-se a titulação até o desaparecimento da coloração azul e o surgimento da cor avermelhada indicando o ponto de viragem. A quantificação de açúcares redutores foi obtida através da seguinte equação (2):

$$\text{mg L}^{-1} \text{ de açúcares redutores} = N \cdot 1000 / \text{volume gasto (mL)}$$

j) Amargor

A análise dos níveis de amargor nas cervejas foi realizada de acordo com a Analytica EBC, 2010. Uma amostra de cerveja degaseificada (10 mL) foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, adicionou-se uma solução de HCl 6 N (0,5 mL) e isooctano (20 mL) e as amostras foram agitadas por 30 minutos. Logo após, a amostra foi centrifugada em recipientes Falcon (5 minutos, 3000 rpm). Em seguida, uma amostra foi retirada da camada de isooctano e determinada com um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 275 nm. O isooctano puro foi a amostra de referência. O amargor foi calculado de acordo com a fórmula: $\text{IBU} = 50 \cdot A$ (IBU—unidades de amargor; A—absorbância a 275 nm).

5.3.4 Análise de Compostos Voláteis

Condições de extração no HS-SPME

Para a extração dos componentes voláteis das amostras foi utilizada metodologia já otimizada, previamente descrita por Alves e colaboradores (2020). Em um vial de 15 mL contendo uma barra de agitação magnética e $0,7500 \pm 0,005$ g de NaCl foi adicionado 7,5 mL de amostra e 20 μL de solução de 4-methyl-2-pentanol ($1,0 \mu\text{L mL}^{-1}$). O vial foi inserido em um recipiente contendo uma jaqueta de vidro o qual estava sobre uma chapa de agitação magnética e conectado a um banho termostaticado com circulação de água (SOLAB SL 152, Piracicaba, SP, Brasil). O vial foi mantido em banho de água à $40 \pm 0,2$ °C e o conteúdo foi mantido sob agitação por 5 minutos. A fibra de SPME foi exposta ao headspace do vial o qual foi mantido nessa mesma temperatura por 30 minutos. Foi utilizada fibra de SPME composta por divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane

(DVB/CAR/PDMS) com cobertura de 50/30 μm de espessura e 1 cm de comprimento (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA).

Condições do GCMS

A fibra de SPME contendo os componentes voláteis adsorvidos foi manualmente inserida no injetor do GCMS à 250 °C (modo splitless; equipado com liner de vidro, 0,75 mm I.D.) e mantido por 5 minutos. Os componentes desorvidos foram separados em um Agilent 7890A GCMS usando metodologia adaptada de Benucci e colaboradores (2021). Uma coluna Agilent HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) composta por 95% dimethyl/5% diphenyl polysiloxane foi utilizada com fluxo de gás Hélio de 1,0 ml min⁻¹. A temperatura do forno foi mantida à 40 °C por 5 min seguida de rampa de aquecimento de 40 a 260 °C com taxa de aquecimento de 9 °C min⁻¹. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram configuradas a 300 °C. Os dados foram adquiridos no modo Full Scan com faixa de 30 – 400 m/z. O espectrômetro de massas foi operado com impacto de elétrons a 70 eV. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os picos foram integrados manualmente em software G1701EA GC/MSD Chemstation. As substâncias voláteis foram caracterizadas através da comparação do espectro de massas e do índice de Kovats (KI) experimental para cada componente com os respectivos espectros de massas e índices de Kovats de padrões descritos por Adams (2007). Os valores de KI experimentais foram obtidos a partir da injeção de uma amostra de hidrocarbonetos saturados C7-C30 (Sigma-Aldrich) nas mesmas condições utilizadas para as amostras e calculados de acordo com van den Dool and Kratz (van Den Dool & Kratz, 1963).

5.3.5 Compostos fenólicos individuais

A análise de compostos fenólicos individuais foi realizada nas amostras até a concentração de 6 g L⁻¹ para ambas as origens de lúpulo em razão de possíveis contaminações nas amostras adicionadas de 8 g L⁻¹ de lúpulo nacional e importado, que possam ter influenciado negativamente nos picos observados.

As amostras de cerveja foram analisadas quanto à composição fenólica usando um equipamento de HPLC (Agilent 1260, Agilent Technologies) acoplado a uma coluna de fase reversa (HPLC Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 μm) e

arranjo de diodos. As amostras foram filtradas (0,45 µm, filtros de seringa de nylon, 15 mm, tecnologias Agilent, Alemanha) antes da injeção. O sistema solvente foi baseado em 0,2% de ácido acético em água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) e 0,2% de ácido acético em MeOH puro (grau HPLC, Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase A e B, respectivamente. Para a separação cromatográfica foi utilizado 1% de B por 2 min, depois de 1 a 20% em 4 min e de 20 a 30% em 4 min, que foi mantido em 30% por 5 min. Em seguida, o solvente foi trocado de 30 para 50% em 5 minutos e mantido por mais 5 minutos. Um gradiente de 50 a 100% de B foi estabelecido em 5 min com 5 min de espera. Então, o solvente B voltou a 1% em 2 min com 3 min de espera antes da próxima injeção. O tempo total de análise foi de 40 minutos. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 5 µL e o compartimento da coluna foi de 30 °C. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando uma curva de calibração de cada padrão. O método HPLC foi validado determinando a linearidade da curva de calibração, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). O limite de detecção foi determinado pelo método da relação sinal-ruído.

5.3.6 Análise Sensorial

Amostras

Nove amostras de cervejas referentes aos tratamentos conforme a origem e a concentração de lúpulo no *dry hopping* foram fornecidas aos participantes. As cervejas foram mantidas em garrafas de vidro âmbar com capacidade para 600 mL, as quais foram resfriadas até uma temperatura de 10°C. As garrafas referentes a cada um dos tratamentos foram abertas e utilizadas para as análises no mesmo dia da avaliação.

Painel de Julgadores

Um painel composto por 10 julgadores (estudantes e funcionários da Universidade) foi selecionado com base no interesse e na disponibilidade. O treinamento do painel ocorreu em quatro sessões espaçadas por sete dias cada uma delas. Durante as sessões, os participantes foram treinados com base na

intensidade das características de modo a propiciar uma familiaridade com todos os atributos sensoriais das cervejas.

Procedimento

Os participantes avaliaram as cervejas em duas sessões em dois dias consecutivos para não ocorresse saturação do paladar dos julgadores. Na primeira e segunda sessão, quatro e cinco tratamentos foram apresentados respectivamente e de forma aleatória. A avaliação ocorreu em uma sala com temperatura controlada (24°C) e as amostras foram servidas à 10°C em taças do tipo Floripa (Figura 11). As amostras foram codificadas com numeração de três dígitos cada. Os membros do painel sensorial pontuaram as amostras de cerveja de forma descritiva quanto aos atributos: consistência da espuma, estabilidade da espuma, carbonatação, álcool, acidez, amargor, corpo e características aromáticas (ANEXO B) em uma escala de 1 até 5, representando de muito baixo até muito forte. Para transmitir os resultados de forma mais confiável, água e bolachas salgadas foram servidos entre as amostras.

Figura 11. Taça do tipo Floripa utilizada para a análise sensorial das cervejas



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Comitê de Ética em Pesquisa

Por se tratar de análise sensorial envolvendo seres humanos, o projeto desta tese foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC), tendo sido aprovado sob o número de parecer 4.859.714, em atendimento à Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS) nº 466/12 (ANEXO A). No dia da avaliação sensorial, foram explicados os objetivos do

experimento e todos os julgadores assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), conforme determinação do Comitê de Ética em Pesquisa.

Análise dos dados

O tratamento dos dados foi realizado com base na análise multivariada através da análise de componentes principais a qual fornece informações importantes sobre a estrutura do conjunto de dados. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa R com o objetivo de separar os tratamentos em diferentes grupos (R CORE TEAM, 2013).

5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.4.1 Características físico-químicas

Na análise de componentes principais, os dois primeiros componentes representaram 67% da variação obtida (54,7% para a componente principal 1 e 12,3% para a componente principal 2) permitindo a análise conjunta das variáveis e dos tratamentos em um gráfico bidimensional. Identificou-se a diferenciação dos tratamentos em principalmente cinco grupos (Figura 7).

De acordo com a Dimensão 1, há uma associação positiva entre as variáveis atividade antioxidante, proteínas, amargor, compostos fenólicos totais e flavonoides com os tratamentos Imp4, Imp6, Bra6 e Bra8, uma vez que os mesmos estão à direita do gráfico, seguindo direção e sentido dos vetores que representam tais variáveis. Consegue-se observar uma diferenciação em dois principais grupos entre esses tratamentos, ficando evidente que a adição de 8 g/L do lúpulo brasileiro “Comet” durante o dry-hopping, proporcionou os maiores valores para as características acima citadas. Além disso, esse tratamento também sofre influência das variáveis com maiores cargas na dimensão 2 em função de estar posicionado mais acima dos tratamentos pertencentes ao grupo I.

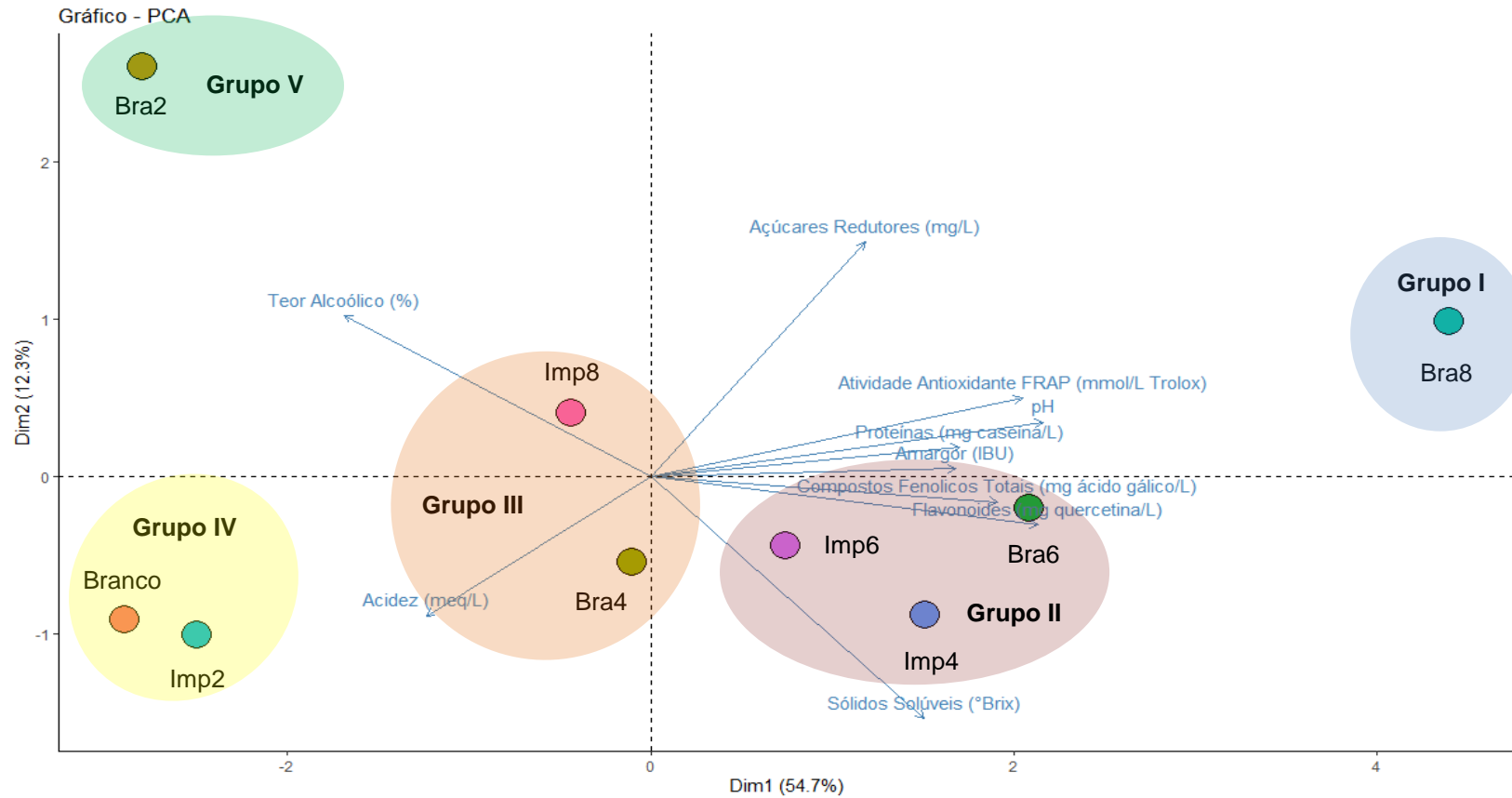
Cerca de 30% dos polifenóis da cerveja são originários do lúpulo, portanto, a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais dependem da quantidade e da qualidade dessa matéria-prima, assim como, do processo de produção das cervejas (DE KEUKELEIRE *et al.*, 1999; CALLEMIEN *et al.*, 2005;

NARDINI; FODDAI, 2021). De acordo com os resultados obtidos, a maior quantidade de lúpulo brasileiro adicionado durante o dry-hopping proporcionou os maiores valores para essas características, indicando que o lúpulo nacional possui qualidade satisfatória para ser utilizado na produção de cervejas através da adoção desta técnica.

Cervejas com alto teor de fenólicos e elevada atividade antioxidante, características encontradas no tratamento Bra8, apresentam melhor qualidade, sabor e aromas mais estáveis, estabilidade da espuma e vida útil mais longa em comparação com cervejas com níveis mais baixos de fenólicos e propriedades antioxidantes mais fracas (WOFFENDE *et al.*, 2001; CALLEMIEN *et al.*, 2005; GUIDO *et al.*, 2007).

Ainda na Dimensão 1, pode-se observar uma correlação positiva dos tratamentos Branco, Bra2, e Imp2 com o teor alcoólico e a acidez total das cervejas, devido à posição destes tratamentos no gráfico. As cervejas originadas destes tratamentos estão diferenciadas basicamente pelas variáveis açúcares redutores e sólidos solúveis totais, alocadas na Dimensão 2, onde, Branco e Imp2 formam o Grupo IV, devido a maior quantidade de sólidos solúveis totais e o Bra2 forma o Grupo V devido a maior presença de açúcares redutores. O Grupo III possui valores intermediários entre os Grupos I e II e os Grupos IV e V.

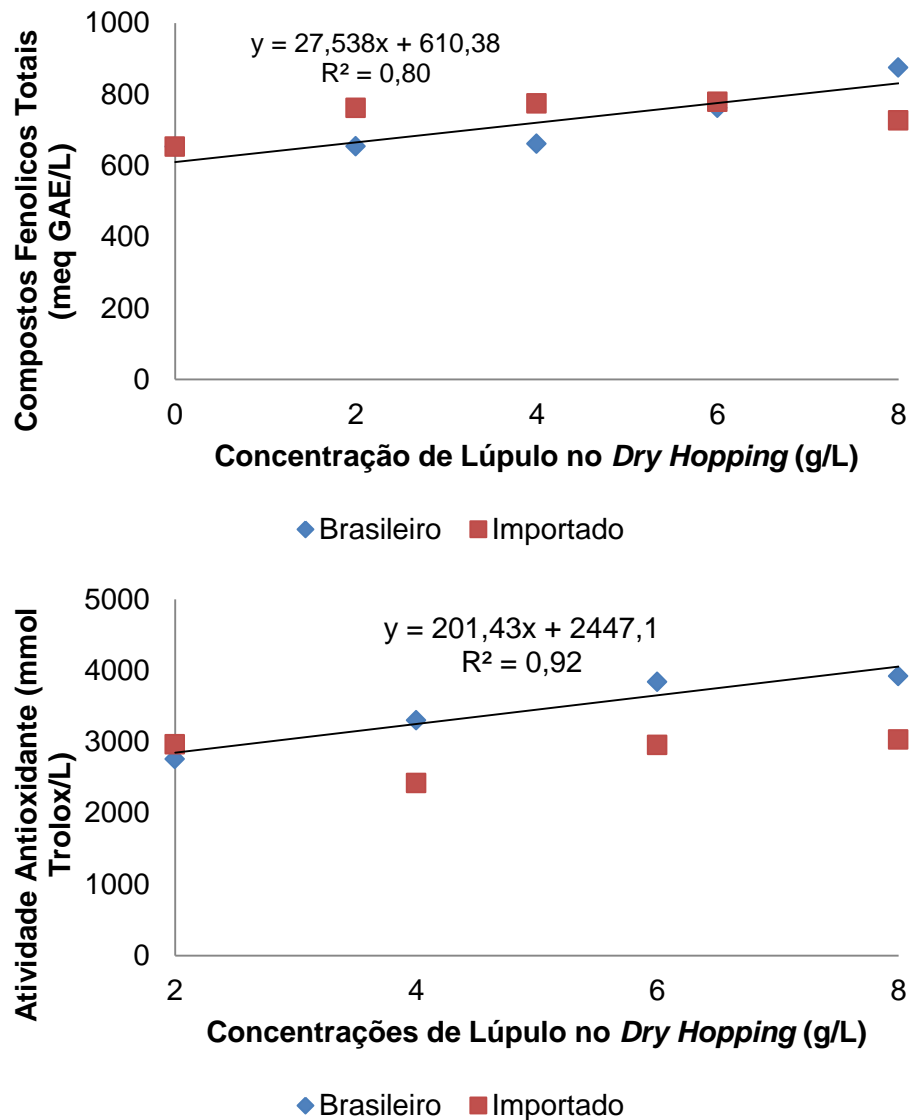
Figura 12. Análise dos componentes principais (ACP) para as variáveis: açúcares redutores; atividade antioxidante; compostos fenólicos totais; flavonoides; proteínas; amargor; acidez total; pH e teor alcoólico para as cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Na Figura 8, pode-se observar a cinética das variáveis compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da cerveja em relação à quantidade de lúpulo adicionado no processo de *dry hopping*. Quando se utilizou o lúpulo brasileiro, verificou-se um aumento significativo de 34% (acréscimo de 220 meq GAE L⁻¹) nos valores dessa variável até a concentração de 8 g L⁻¹. Já o uso do lúpulo importado não alterou essa característica com o aumento da concentração. A atividade antioxidante, quando utilizado o lúpulo brasileiro, elevou-se em 42% (acréscimo de 1160 mmol Trolox L⁻¹) até a concentração de 8 g L⁻¹. Já o uso do lúpulo importado apresentou resultados semelhantes aos compostos fenólicos totais, onde não houve alteração nos valores em função das concentrações adicionadas.

Figura 13. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo brasileiro e importado em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

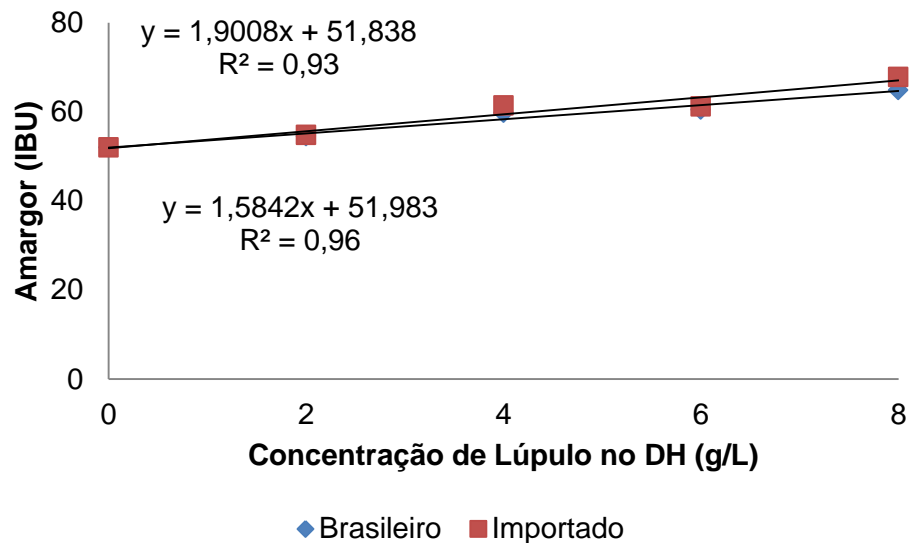
As cervejas produzidas com *dry hopping* têm mais polifenóis derivados do lúpulo em comparação com aquelas em que essa técnica não foi utilizada (OBERHOLSTER, 2016). O lúpulo possui até 50 vezes mais polifenóis por peso em comparação com o malte e é por isso que quando grandes quantidades dessa matéria prima são utilizadas para a produção de cervejas a concentração fenólica pode aumentar rapidamente (GREEN, 2020). Esta afirmação está de acordo com os

resultados encontrados para as cervejas produzidas com a utilização do lúpulo brasileiro, cujos valores de compostos fenólicos aumentaram significativamente de acordo com o aumento das concentrações da matéria prima no *dry hopping*. Podemos observar que o mencionado por Green (2020) não ocorreu com o uso do lúpulo importado, visto que as cervejas produzidas com o mesmo não tiveram aumento significativo na concentração de polifenóis de acordo com o aumento na concentração. O teor de compostos fenólicos na cerveja é muito influenciado pelo fator genético de suas matérias-primas e, portanto, pelas condições ambientais e manejo da cultura (LUGASI, 2003). A afirmação explica a maior quantidade de compostos fenólicos observada nas cervejas produzidas com lúpulo brasileiro.

De acordo com a análise de componentes principais (Figura 7), a atividade antioxidante possui correlação positiva com o teor de compostos fenólicos totais na cerveja. O resultado está de acordo com Martinez-Gomez *et al.* (2020), os quais afirmam que a atividade antioxidante deve-se principalmente ao conteúdo de compostos fenólicos. Essa variável apresenta mudanças conforme as matérias-primas utilizadas e o método de produção das cervejas (INIGUEZ; ZHU, 2020).

Na Figura 9, pode-se observar a cinética do amargor da cerveja em relação à quantidade de lúpulo adicionado no processo de *dry hopping*. Quando se utilizou o lúpulo brasileiro, verificou-se um aumento significativo de 24% (acréscimo de 13 IBU) nos valores dessa variável até a concentração de 8 g L⁻¹. Já com o uso do lúpulo importado observou-se aumento de 30% nas unidades de amargor (16 IBU) até 8 gramas L⁻¹.

Figura 14. Amargor de cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo brasileiro e importado em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Os resultados do presente estudo indicaram que a adição de qualquer concentração de lúpulo durante o *dry hopping*, seja importado ou brasileiro, originou cervejas com amargor mais elevado em comparação com o tratamento em que não foi adotado a lupulagem a frio. O resultado está de acordo com o encontrado por Salamon e colaboradores (2022), onde as unidades de amargor das cervejas adicionadas de lúpulo no *dry hopping* se elevaram em quase 18%.

As humulonas, relacionadas à contribuição para o gosto amargo da cerveja, são propensas a sofrer degradações durante o armazenamento do lúpulo e uma das principais características de sua oxidação é a produção de humulinonas (DURELLO *et al.*, 2019). As humulinonas estão intimamente relacionadas aos iso-alfa-ácidos, e quando o lúpulo é adicionado durante a lupulagem a frio, esse composto se dissolve suficientemente para influenciar no amargor (SMITH *et al.*, 2004). Portanto, cervejas produzidas pelo processo de *dry hopping* com lúpulos que contém altos níveis de humulinonas podem ter o amargor alterado.

Algazzi & Shelmlhammer (2016) realizaram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a intensidade do amargor das humulinonas e para isso, adicionaram extratos ricos deste composto em cervejas não lupuladas com concentração que variaram de 8 até 40 mg L⁻¹. Com isso, descobriram que as humulinonas possuem um amargor equivalente a 66% do amargor das iso-humulonas, demonstrando que as

humulinonas contribuem para o amargor da cerveja muito mais do que até então se imaginava.

Em outro estudo, Maye e colaboradores (2016) avaliaram a relação da presença de humulinonas em lúpulo com o amargor da cerveja durante o procedimento de lupulagem denominado de “dry-hopping”, o qual objetiva aumentar o aroma de lúpulo da cerveja sem, contudo, aumentar o amargor da bebida. Entretanto, estes autores encontraram teores de até 24 mg L⁻¹ de humulinonas em cervejas submetidas ao “dry-hopping”, revelando que é possível agregar amargor às cervejas submetidas a este procedimento de lupulagem. Os mesmos autores recomendam ainda que os cervejeiros realizem a análise de determinação do índice de armazenamento de lúpulos que serão utilizados no “dry-hopping”, de modo a evitar o uso de lúpulos velhos e oxidados neste procedimento de lupulagem. Desta forma, sugere-se através dos resultados encontrados no presente estudo, que o lúpulo importado estava em processo mais avançado de oxidação, visto que observou-se um maior percentual de aumento nas unidades de amargor com o aumento da concentração adicionada em comparação com o brasileiro, indicando uma maior presença de humulinonas.

5.4.2 Perfil de compostos voláteis das cervejas em estudo

A Tabela 2 mostra o tempo de retenção, o índice de Kovats da literatura, o índice de Kovats calculado e o descritor aromático para os 43 compostos identificados na cerveja via microextração em fase sólida headspace e análise GC-MS.

Os resultados confirmam uma excelente correspondência entre o índice de Kovats calculado e o presente na literatura, sendo que, os valores variaram de 98,5 a 100,6% dependendo do composto.

Para a análise de componentes principais, foram escolhidas duas componentes, com base em uma variância acumulada de 82,90%. O Gráfico foi construído com os compostos mais relevantes para determinar as diferenças entre as concentrações (0; 2; 4; 6 e g L⁻¹) e origens (brasileiro e importado) do lúpulo Comet adicionado no processo de *dry hopping*.

A Figura 10 mostra as variâncias das duas primeiras componentes, que explicam 82,9% do total de informações do modelo, sendo 63,7% explicada pela primeira componente e 19,2% explicada pela segunda componente.

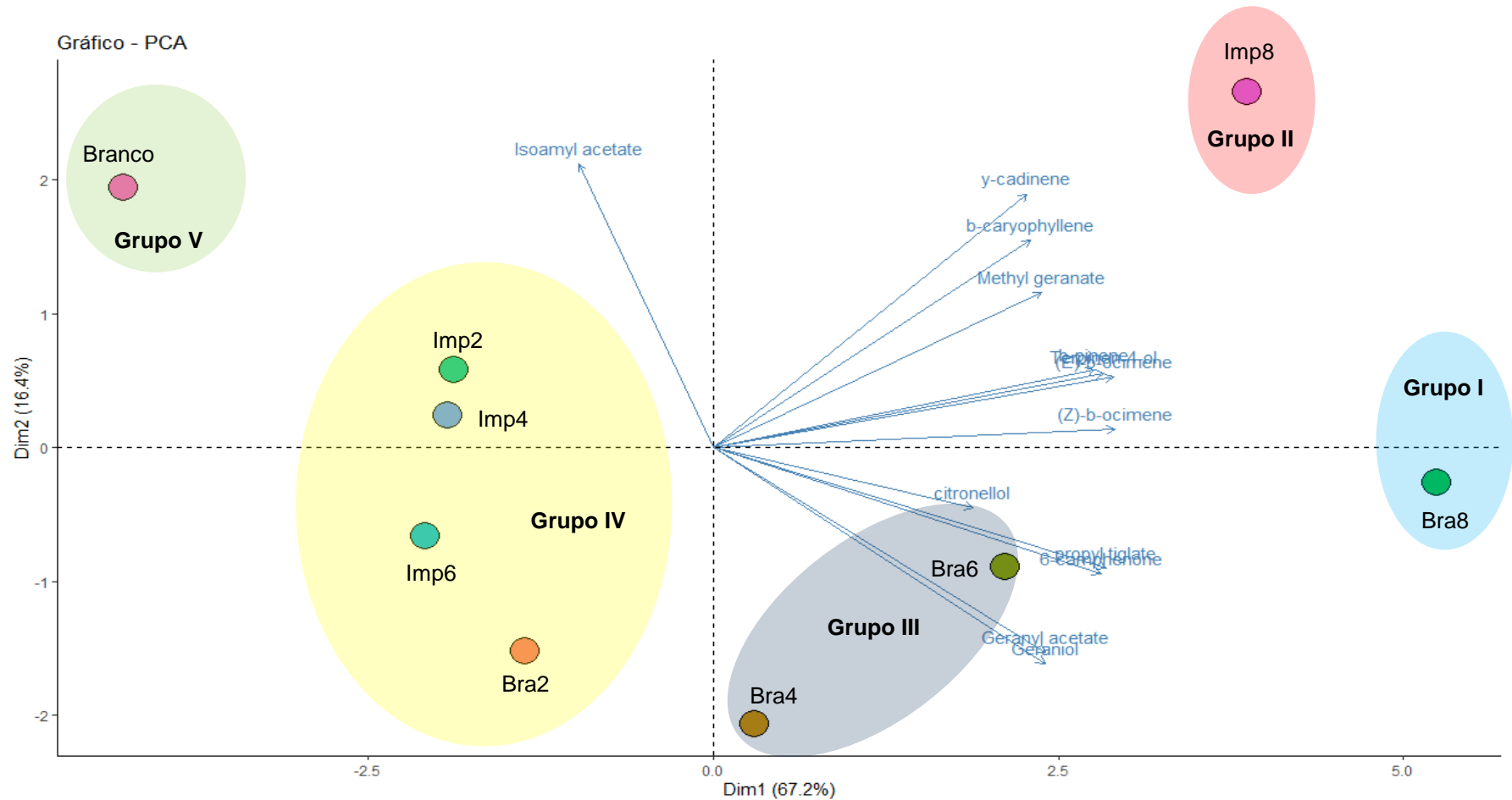
Tabela 2. Compostos identificados nas amostras de cerveja usando microextração em fase sólida headspace e análise GC-MS.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Índice de Kovats Experimental	Índice de Kovats Teórico	Descritor Aromático
Álcool Isoamílico	3,955	742,7	741	Frutas Vermelhas
2-metilbutanol	4,001	744,7	739	Chocolate/Malte
Tolueno	4,604	767,9	774	Doce/Tinta
Butanoato de Etila	5,779	807,9	806	Maçã/Pêssego
Ethylbenzene	7,512	868,8	850	Doce/Gasolina
Acetato de Isoamila	8,072	885,5	862	Frutado/Banana
Acetato de 2-metilbutila	8,130	887,2	881	Frutado
Isobutyl isobutanoate	9,043	920,6	-	Frutado
Mesitylene	10,305	973,2	-	-
2,6-dimethyl-4-heptanone	10,377	976,0	-	-
2-pentyl propanoate	10,432	978,1	-	-
b-pinene	10,850	993,9	979	Herbal
Hexanoato de Etila	11,079	1003,4	998	Maçã Verde/Floral
Isoamyl isobutanote	11,330	1016,6	-	Frutado
Não Identificado	11,413	1021,0	-	-
Propyl tiglate	11,639	1032,6	1038	-
(E)-b-ocimene	11,844	1042,9	1050	Floral, Cítrico
(Z)-b-ocimene	12,055	1053,4	1043	Herbal/Floral/Cítrico
2-nonanone	12,908	1093,8	1090	Frutado
6-camphenone	13,115	1104,3	1097	-
Álcool Fenil Etilico	13,429	1122,8	1107	Floral
Não Identificado	14,169	1164,6	-	-
Terpinen-4-ol	14,536	1184,6	1177	Amadeirado, Picante
Octanoato de Etila	14,905	1205,1	1197	Abacaxi/Pêra/Doce
Citronellol	15,335	1232,5	1226	Floral, Cítrico
Geraniol	15,769	1259,4	1253	Floral
Phenylethyl acetate	15,825	1262,8	1258	Mel/Rosas
Methyl geranate	16,852	1327,8	1325	Frutado, Floral
Citronellyl acetate	17,269	1355,7	1353	Floral
Geranyl acetate	17,731	1385,9	1381	Frutado, Floral
Decanoato de Etila	17,908	1397,3	1396	Uva/Frutado
b-caryophyllene	18,409	1433,3	1419	Picante, Amadeirado
Não Identificado	17,201	1351,2	-	-
y-gurjunene	19,175	1487,2	1477	Amadeirado, Doce
y-cadinene	19,469	1508,3	1514	Amadeirado, Herbal
Cis-calamenene	19,817	1534,9	1540	Especiarias

Não Identificado	19,015	1476,1	-	-
Spathulenol	20,597	1593,0	1575	Herbal/Frutado
Dodecanoato de Etila	20,624	1595,0	1595	Cera/Sabão
1-epi-cubenol	21,062	1629,9	1629	-
Cubenol	21,283	1647,6	1647	Sabão
Valerianol	21,377	1655,0	1658	-

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 15. Análise dos componentes principais (ACP) para os compostos voláteis caracterizados via cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas em cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A componente principal 1 mostra a separação das amostras em relação a concentração e origem do lúpulo, com as cervejas produzidas com a maior concentração de lúpulo importado (8 g L^{-1}) e as cervejas com 4; 6 e 8 g L^{-1} de lúpulo brasileiro nos quadrantes direitos. Neste caso, a associação destes tratamentos é com os compostos: γ -cadineno, beta cariofileno, geranato de metila, beta pineno, tiglatto de propila, Z-beta ocimeno, E-beta ocimeno, citronelol, 6-campenone, 4 terpineol, geraniol e acetato de geranil. O Grupo I, composto pelo tratamento Bra8, apresenta maiores áreas de picos em comparação com o Grupo II (Imp8) e com o Grupo III (Bra4 e Bra6), assumindo, portanto, que os compostos voláteis com maiores cargas na dimensão 1 podem ser importantes na distinção entre as cervejas produzidas com a maior concentração de lúpulo brasileiro com as demais estudadas.

As cervejas as quais não foi aplicado a técnica de dry hopping apresentaram menores teores dos compostos voláteis pertencentes à dimensão 1, visto que, o tratamento em branco ficou localizado mais a esquerda do gráfico. Resultados semelhantes já haviam sido observados anteriormente por outros autores (HASLBECK et al., 2018; CASTRO et al., 2022) com maiores teores terpenos e ésteres nas cervejas em que o lúpulo foi adicionado numa fase posterior ao processo de fabricação da cerveja. Normalmente, os ésteres têm sabor doce e frutado, enquanto as categorias cítrica, picante, herbácea e especiarias podem ser encontradas em terpenóides (STEINHAUS; SCHIEBERLE, 2000; EYRES et al., 2007; VAN OPSTAELE et al., 2012; CIBAKA et al., 2015). Ao adicionar parte do lúpulo na etapa de fermentação, a uma temperatura inferior à exigida em fase de ebulição, podemos evitar a evaporação dos compostos voláteis presentes no lúpulo, bem como sua conversão (FORSTER E GAHR, 2013; (STEENACKERS; DE COOMAN; DE VOS, 2015).

Entre os compostos encontrados nos óleos essenciais de lúpulo, destacam-se terpenos importantes a exemplo do beta cariofileno, responsável pelos aromas amadeirados na cerveja (VAN OPSTAELE et al., 2012) e que está associado aos tratamentos localizados à direita do gráfico, indicando maiores áreas de picos. Embora o beta cariofileno seja um dos principais voláteis do lúpulo, ele é raramente encontrado na cerveja produzida com a adição dessa matéria-prima durante a fervura já que ocorrem perdas consideráveis por evaporação (TAKOI et al., 2010; LAM et al., 1986). De maneira geral, os hidrocarbonetos terpênicos não contribuem

para o aroma de cervejas, exceto quando o *dry hopping* é utilizado (FRITSCH; SCHIEBERLE, 2005; HALEY; PEPPARD, 1983). No presente estudo, o tratamento controle, cujo não foi realizado *dry hopping*, tem a presença desse composto (apesar de pequenas quantidades) o que corrobora com a afirmação acima.

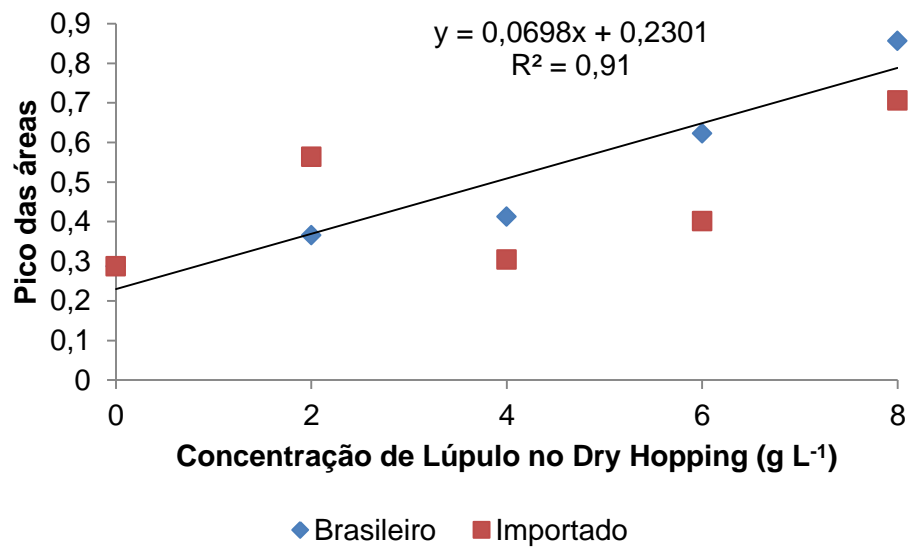
Os voláteis 4-terpineol, geranato de metila, beta cariofileno e γ -cadineno são conhecidos como metabólitos secundários derivados do lúpulo (PREEDY, 2009; INUI *et al.*, 2013; PRAET *et al.*, 2015) e portanto, são compostos responsáveis pela diferenciação da fermentação e da lupulagem. Os resultados indicam que a partir da adição de 4 g L^{-1} de lúpulo brasileiro no *dry hopping*, maior a presença desses compostos voláteis na cerveja. O mesmo não ocorreu com o lúpulo importado, que apenas a adição de 8 g L^{-1} apresentou correlação positiva com esses compostos. O resultado demonstrou uma ampla gama de compostos que podem ocorrer em distintas concentrações dependendo de onde o lúpulo foi cultivado e da concentração utilizada e está de acordo com o encontrado por La Fontaine e colaboradores (2018), os quais encontraram uma ampla e significativa gama de intensidades aromáticas dependendo do local de cultivo do lúpulo, das técnicas de manejo e das condições de colheita e secagem. Outros estudos confirmam que fatores como a localização geográfica, clima e aspectos agrônômicos influenciam a composição volátil do lúpulo (CEH *et al.*, 2007; KISHIMOTO *et al.*, 2008; MOZNY *et al.*, 2009).

O terroir exerce forte influência no cultivo do lúpulo, visto que, o produto comercial da cultura são os compostos químicos presentes na lupulina, e estes são decorrentes do metabolismo especializado da planta, também conhecido como metabolismo secundário. Esses metabólitos são sintetizados pela planta como uma estratégia de adaptação a diferentes mudanças que ela possa sofrer, seja por ação do homem (manejo hídrico, nutricional...), do ambiente (luminosidade, precipitação, interação com outros micro-organismos...) e da própria planta (idade fisiológica...), sendo que, esses fatores podem exercer influência na composição química dos cones de lúpulo (WOLFE *et al.* 2016).

Takoi *et al.* (2017) demonstraram que o beta pineno foi encontrado em altas concentrações nos lúpulos Centennial e Citra, mas não foi transferido para a cerveja mesmo quando utilizado altas taxas no *dry hopping*. Portanto, há evidências de que o beta pineno pode não ser um composto diretamente responsável pelo aroma lupulado na cerveja produzida com *dry hopping*. Ao contrário, de acordo com a

Figura 11, observamos um aumento na concentração de beta pineno com o aumento na quantidade de lúpulo brasileiro adicionado no *dry hopping*, indicando que o lúpulo Comet (rico em beta pineno) é capaz de transferir o composto para a cerveja.

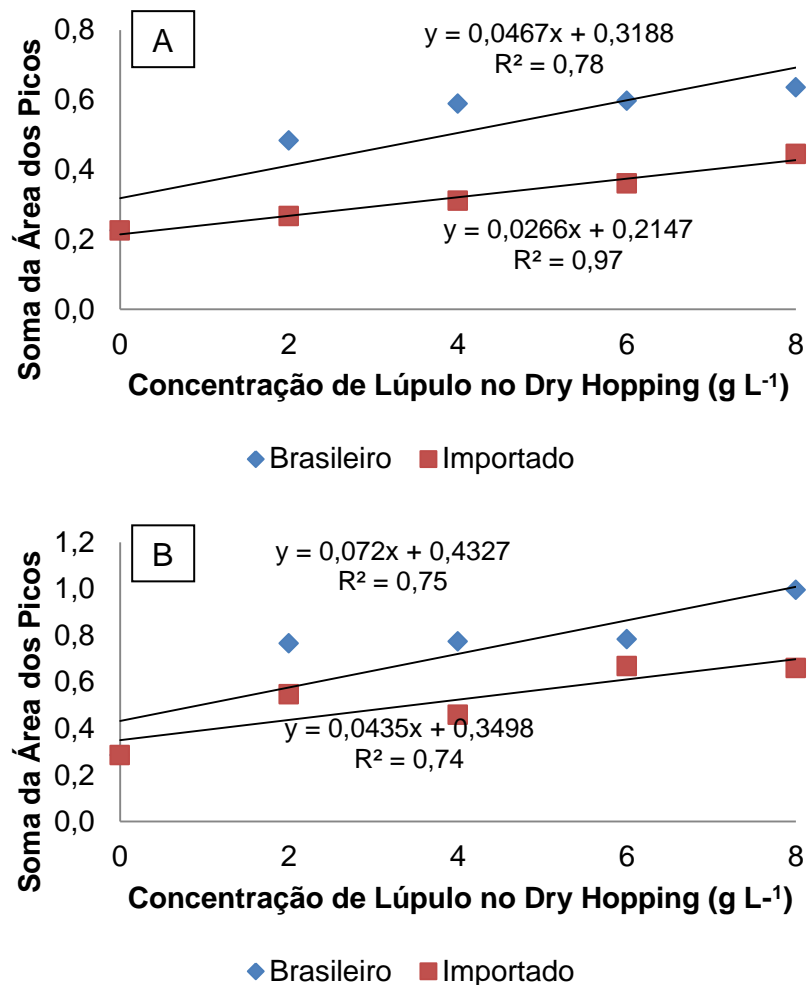
Figura 16. Áreas normalizadas para o composto beta pineno em cervejas produzidas com *dry hopping* utilizando diferentes concentrações e origens do lúpulo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022

A Figura 12 mostra a regressão referente à soma das áreas de picos dos compostos geraniol e acetato de geraniol. Os resultados mostram uma resposta linear e evidenciam um aumento na concentração de geraniol e acetato de geraniol com o aumento na concentração de lúpulo, independente da origem. Entretanto, verifica-se que os maiores valores foram encontrados no lúpulo brasileiro em comparação com o importado para ambos os compostos. O aumento geral dos teores de voláteis, quando se utiliza a técnica de *dry hopping*, é consistente com os resultados de outros autores, embora a maioria deles concorde que o efeito específico depende de muitos outros fatores, como o momento exato da adição, a variedade do lúpulo ou mesmo o seu estado de maturação (DRESEL et al., 2013 ; FORSTER E GAHR, 2013; SCHNAITTER et al., 2016; LAFONTAINE et al., 2018; SANZ et al., 2019).

Figura 17. Áreas normalizadas para os compostos Geraniol (A) e Acetato de Geraniol (B) em cervejas produzidas com *dry hopping* utilizando diferentes concentrações e origens do lúpulo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

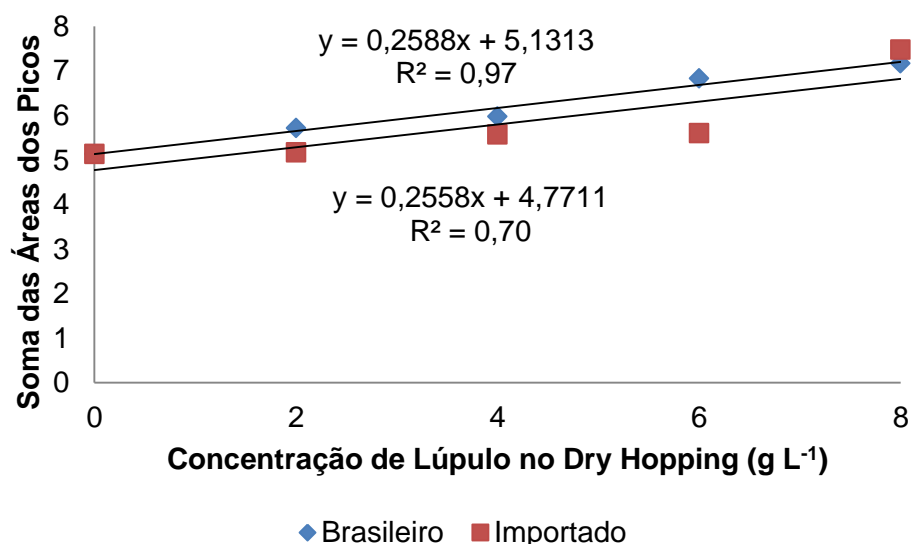
Em 1986, Lam *et al.* afirmaram que os álcoois monoterpênicos, a exemplo do geraniol, são altamente ativos no aroma e contribuem para aromas florais e cítricos em cervejas com lupulagem à frio. Vollmer e Shellhammer (2016) identificaram o geraniol como um composto volátil de impacto para o aroma de cervejas produzidas com *dry hopping*. Na presença de levedura, o geraniol pode ser transformado a outros compostos como o citrionelol. No presente estudo, o citrionelol foi encontrado em maiores intensidades nas cervejas produzidas com 8 g L⁻¹ de lúpulo brasileiro, mesmo resultado encontrado para o composto geraniol. Proporcionando aromas picantes, florais, e cítricos, geraniol tem sido proposto como marcador para a intensidade e qualidade do aroma lupulado em cervejas (PEACOCK; DEINZER,

1981; LAM et al., 1986; STEINHAUS; SCHIEBERLE, 2000; SCHÖNBERGER; KOSTELECKY, 2011; VAN OPSTAELE et al., 2012; EYRES et al., 2007;).

A dimensão 2 mostra a associação do composto acetato de isoamila com as amostras em branco, uma vez que este composto está localizado no quadrante superior esquerdo. Esse composto surge especialmente no processo de fermentação da cerveja (OLANIRAN *et al.*, 2017), embora também tenham sido encontradas áreas de pico pequenas nas amostras onde foi realizado o *dry hopping*. O mesmo resultado foi encontrado por Ceola *et al.* (2019), onde, ao analisar a influência do cultivar no perfil volátil de cervejas os autores verificaram a presença deste composto nas amostras em que o lúpulo não foi adicionado. Em contrapartida, a cerveja produzida sem *dry hopping* apresentou correlação negativa com os compostos geraniol e acetato de geraniol os quais são transmitidos à cerveja via lúpulo.

Os resultados evidenciam um aumento na concentração de terpenos na medida em que se elevaram as concentrações de lúpulo no *dry hopping*, independente da origem (Figura 13).

Figura 18. Áreas normalizadas para terpenos em cervejas produzidas com *dry hopping* utilizando diferentes concentrações e origens do lúpulo.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022

Os compostos terpênicos são produtos naturais, principalmente metabólitos secundários, produzidos por plantas, podendo também ser produzidos por leveduras

ou por meio de reações de biotransformação (ALVES *et al.*, 2015). Os terpenos são uma das principais famílias químicas presentes na composição volátil do óleo essencial de lúpulo (WANG *et al.*, 2008).

Diversas variáveis contribuem para a presença de compostos terpênicos na cerveja, a exemplo do lúpulo (metabolismo da planta, condições de armazenamento, local de plantio) e técnicas de lupulagem (*dry hopping*) (DRESEL *et al.*, 2013, PRAET *et al.*, 2015). A afirmação está de acordo com o encontrado no presente estudo, onde podemos observar maiores quantidades de terpenos na cerveja produzida com lúpulo brasileiro, indicando que o local de plantio influencia na composição química da planta e conseqüentemente da cerveja. Outro ponto importante é que a técnica de *dry hopping* proporcionou cervejas com maiores quantidades de terpenos em comparação ao tratamento controle, aumentando significativamente de acordo com as concentrações.

Se a função de adicionar lúpulo à cerveja pela técnica de *dry hopping* é principalmente conferir aroma, de acordo com os resultados encontrados no presente estudo, o preço do produto pode ser baseado em indicadores que dependem da origem da matéria-prima que dará maior complexidade aos aromas da bebida. Desta forma, a utilização do lúpulo brasileiro pode agregar valor ao produto final pela maior carga de aromas conferida à bebida, sendo que, os custos podem ser reduzidos visto que menores concentrações de lúpulo brasileiro adicionados à cerveja proporcionam quantidade de compostos voláteis semelhante à adição da maior concentração de lúpulo importado estudada neste trabalho.

Os resultados deste estudo indicam que o processamento na pós colheita do lúpulo pode impactar o potencial aromático das cervejas durante o *dry hopping*.

5.4.3 Perfil de compostos fenólicos das cervejas em estudo

A Tabela 3 mostra o comprimento de onda, o tempo de retenção, a equação da reta, o R^2 , o limite de detecção e o limite de quantificação para os 18 compostos identificados na cerveja via cromatografia líquida de alta eficiência. Todas as curvas de calibração apresentaram uma forte correlação linear entre a concentração dos compostos analisados e as áreas de picos cromatográficos, conforme evidenciado pelos valores dos coeficientes de determinação (R^2), permitindo a quantificação dos

compostos fenólicos nas amostras de cerveja. Entre os 18 compostos analisados, 12 foram identificados em pelo menos uma amostra.

Para a análise de componentes principais, foram escolhidas duas componentes, com base em uma variância acumulada de 86,9%. O Gráfico foi construído com os 12 compostos identificados em pelo menos uma das amostras, os quais foram relevantes para determinar as diferenças entre as concentrações (0; 2; 4 e 6 g L⁻¹) e origens (brasileiro e importado) do lúpulo Comet adicionado no processo de *dry hopping*.

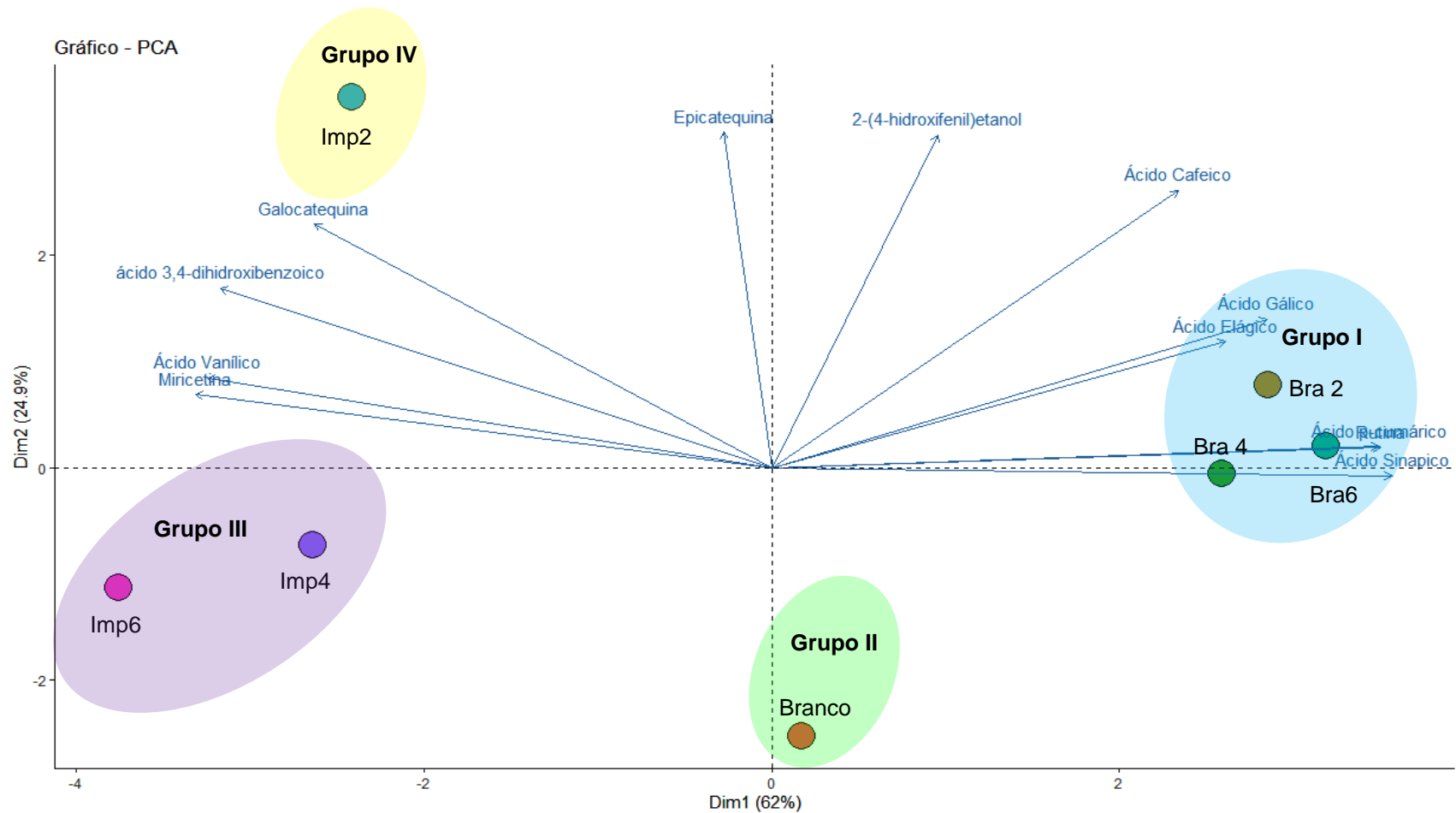
A Figura 14 mostra as variâncias das duas primeiras componentes, que explicam 86,9% do total de informações do modelo, sendo 62,0% explicada pela primeira componente e 24,90% explicada pela segunda componente.

Tabela 3. Comprimento de onda, tempo de retenção, equação da reta, R², limite de detecção e limite de quantificação para os 19 compostos identificados na cerveja produzida com diferentes concentrações de lúpulo “Comet” durante a etapa de *dry hopping*.

Composto	Polifenol	λ (nm)	TR (min)	Equação da reta	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
1	Ácido Gálico	255	5,979	$y = 1550159,55x + 627914,51$	0,9980	0,000669	0,00668571
2	Galocatequina	255	8,130	$y = 162492x + 72412$	0,9962	0,012275	0,12274591
3	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	255	8,567	$y = 2402217,95 + 1081177,78$	0,9993	0,000384	0,00383829
4	2-(4-hidroxifenil)etanol	280	10,601	$y = 901595x + 392289$	0,9979	0,001618	0,01618347
5	Ácido Vanílico	255	12,471	$y = 2825268,59x - 974532,62$	0,9838	0,000420	0,00419602
6	Ácido Cafeico	320	12,705	$y = 4825927,96x + 1960324,51$	0,9973	0,000207	0,00207195
7	Epicatequina	280	13,058	$y = 519655x + 165455$	0,9930	0,001789	0,01788827
8	Ácido Siríngico	280	13,257	$y = 2492983,64x + 1527153,91$	0,9917	0,001180	0,01179772
9	Ácido p-cumarico	320	16,167	$y = 6205117,62x + 2151677,30$	0,9996	0,000323	0,00322888
10	Ácido Sinapínico	320	17,788	$y = 4568685,97x + 1072369$	0,9982	0,000252	0,00252196
11	Ácido Ferúlico	320	18,310	$y = 4154370,57x + 1614583,50$	0,9990	0,000224	0,00223732
12	Miricitrina	360	20,787	$y = 1389801,21x + 570183,28$	0,9983	0,000511	0,00511037
13	Rutina	360	21,580	$y = 1418048,15x + 590214,45$	0,9986	0,001028	0,01027755
14	Ácido Elágico	255	22,160	$y = 2723406,12x + 634171,48$	0,9990	0,000390	0,00389978
15	Miricetina	360	22,651	$y = 2159130,63x + 516689,02$	0,9983	0,000701	0,0070107
16	Quercetina	280	24,673	$y = 6576666,49x + 1853766,32$	0,9993	0,000225	0,00224822
17	Ácido Cinâmico	360	25,608	$y = 2519950,60x + 892064,18$	0,9988	0,000552	0,00551698
18	Kaempferol	360	28,999	$y = 2437818,15x + 977632,71$	0,9990	0,001288	0,01288356

Fonte: Própria autora, 2022.

Figura 19. Análise dos componentes principais (ACP) para os compostos fenólicos caracterizados via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cervejas produzidas a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.



Fonte: Própria autora, 2022.

A componente principal 1 mostra a separação das amostras em relação a concentração e origem do lúpulo, com as cervejas produzidas com lúpulo brasileiro no quadrante direito e as cervejas produzidas com lúpulo importado no quadrante esquerdo, assumindo portanto, que os compostos fenólicos com maiores cargas na dimensão 1 podem ser importantes na distinção entre as cervejas produzidas com o lúpulo brasileiro e o lúpulo importado.

De acordo com a dimensão 1, há uma associação positiva das cervejas produzidas com lúpulo brasileiro (Grupo I) com os compostos ácido sinápico, rutina e ácido p-cumárico.

Os compostos miricetina, ácido vanílico e ácido 3,4 dihidroxibenzoico possuem correlação positiva com as cervejas adicionadas de lúpulo importado no processo de *dry hopping*. Em relação a planta de lúpulo, a miricetina é um dos flavonoides dominantes (DUŠEK et al., 2021). Esses tratamentos foram separados em principalmente 2 grupos (Grupo III e IV), os quais estão diferenciados basicamente pelas variáveis com maiores cargas na dimensão 2.

O Grupo II, composto pelo tratamento em que as cervejas foram produzidas sem adição de lúpulo no *dry hopping*, está localizado em uma posição mediana aos demais grupos, indicando uma concentração intermediária dos compostos pertencentes a dimensão 1 em relação à adição de lúpulo brasileiro e importado.

Os seguintes compostos fenólicos possuem maiores cargas na dimensão 2: galocatequina, epicatequina, 2-(4-hidroxifeniletanol) e ácido cafeico. As cervejas as quais não foi aplicado a técnica de *dry hopping* apresentaram menores teores dos compostos fenólicos pertencentes à dimensão 2, visto que, o tratamento em branco está localizado no quadrante mais inferior do gráfico.

De acordo com estudos anteriores, o conteúdo fenólico da cerveja, tanto qualitativa quanto quantitativamente, depende da matéria prima (lúpulo e malte) bem como do processo de fabricação (WANNENMACHER et al., 2018).

Em geral, a composição fenólica das cervejas apresentou uma variada concentração de acordo com a origem e a quantidade de lúpulo utilizado durante o processo de *dry hopping*. Quercetina, ácido cinâmico, ácido ferúlico, kaempferol, miricitrina e ácido siríngico não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. Silva e colaboradores (2021) afirmam que o kaempferol foi o composto menos presente em diferentes amostras de cervejas artesanais brasileiras, sendo

que, foi identificado em apenas duas em concentrações abaixo do limite de quantificação.

Por outro lado, ácido p-cumárico foi encontrado somente nas cervejas produzidas com lúpulo brasileiro, com aumento nos teores desse composto à medida em que se elevaram as concentrações no *dry hopping*. O ácido elágico esteve presente nas cervejas apenas quando as maiores concentrações de lúpulo brasileiro foram utilizadas (4 e 6 g L⁻¹).

Entre os compostos fenólicos individuais identificados na cerveja, o ácido ferúlico, ácido p-cumárico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido vanílico e ácido sinápico estão entre os principais compostos nas formas livre e ligada (CARVALHO; GUIDO, 2022). Dentre os compostos acima citados, apenas o ácido ferúlico não foi detectado em nenhuma das amostras de cerveja analisadas (Tabela 4).

Sabe-se que a técnica de *dry hopping* permite a extração de polifenóis e outros compostos que contribuem para o amargor da cerveja (OLADOKUN *et al.*, 2017). Os resultados do presente estudo estão de acordo com a afirmação, visto que, o tratamento em que não foi utilizado o *dry hopping* apresentou a menor soma dos compostos fenólicos identificados nas cervejas (Tabela 4). De acordo com Castro *et al.* (2022), uma maior concentração de polifenóis foi observada em cervejas elaboradas sem o uso do *dry hopping* o que corrobora com os resultados deste estudo.

A evolução do conteúdo fenólico de diferentes cervejas durante o seu processo de produção apresentou variações de cada composto, onde alguns diminuiram após a fervura, outros permaneceram constantes e outros até mesmo aumentaram as suas concentrações (GANBAATAR *et al.*, 2015). A afirmação está de acordo com os resultados deste trabalho, onde percebe-se uma variação de cada composto de acordo com a adoção ou não do *dry hopping* (Tabela 4).

Zhao (2015) estabeleceu que o teor de polifenóis nas cervejas aumenta durante a mostura, entretanto, diminui significativamente durante a fermentação e as etapas subsequentes de armazenamento. Isso provavelmente é explicado pela precipitação e adsorção destes compostos à levedura durante o processo de fermentação. No caso deste particular estudo, a adição de parte do lúpulo durante o *dry hopping* levou a uma maior extração de substâncias fenólicas e uma maior quantidade de compostos fenólicos na cerveja, o que corrobora com a afirmação anterior e com o encontrado por Castro *et al.* (2022). Em um trabalho onde avaliou-

se o conteúdo fenólico de cervejas produzidas por *dry hopping*, observou-se um aumento nas concentrações o que está de acordo com os resultados deste estudo (HAUSER et al., 2019). Forster e colaboradores (2013) relataram uma taxa de transferência de 50-60% de compostos fenólicos do lúpulo para a cerveja durante o *dry-hopping*.

Sendo assim, o *dry hopping* é uma boa estratégia para melhorar o perfil fenólico e o conteúdo na cerveja sendo de grande importância para atingir níveis adequados de compostos fenólicos com benefícios tanto para a estabilidade da cerveja quanto para a saúde do consumidor.

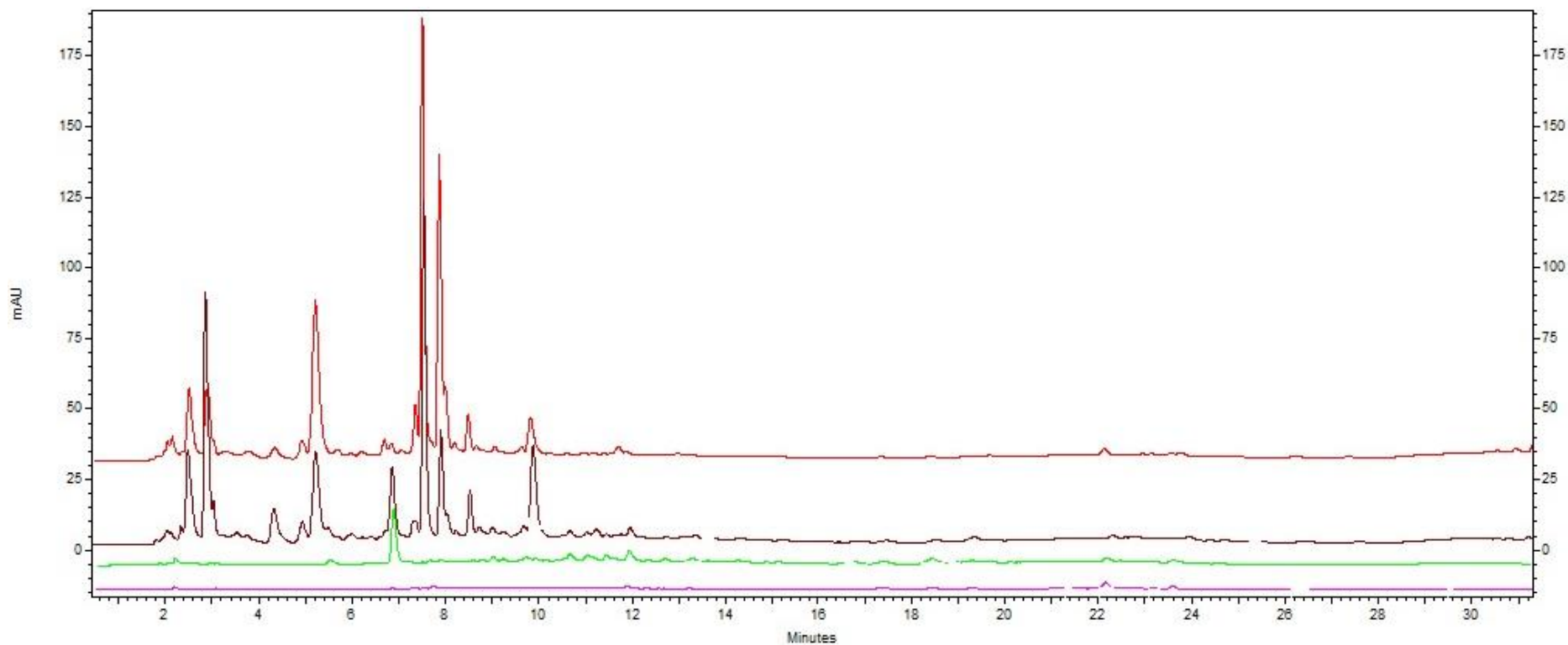
Um exemplo de cromatograma obtido para as amostras controle pode ser visualizado na Figura 15.

Tabela 4. Concentração (mg L⁻¹) de compostos fenólicos em cervejas produzidas com diferentes locais de origem e concentrações de lúpulo no processo de *dry hopping*.

Compostos Fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)						
	Branco	Bra2	Bra4	Bra6	Imp2	Imp4	Imp6
Ácido Gálico	1,23	2,15	1,35	1,48	1,34	0,79	0,63
Galocatequina	4,65	6,97	5,58	5,93	13,35	7,95	11,10
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	<LOD	0,19	<LOD	0,08	5,30	2,99	4,12
2-(4-hidroxifenil)etanol	0,71	2,12	1,35	1,25	2,08	1,24	0,72
Ácido Vanílico	<LOD	0,03	<LOD	<LOD	1,23	0,70	1,74
Ácido Cafeico	<LOD	0,15	0,20	0,21	0,19	<LOD	<LOD
Epicatequina	0,14	0,18	0,24	0,25	0,57	0,23	0,05
Ácido Siríngico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido p-cumárico	<LOD	0,07	0,08	0,14	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido Sinápico	0,30	0,97	0,77	0,96	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido Ferúlico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Miricitrina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Rutina	0,78	4,17	3,62	4,35	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido Elágico	<LOD	<LOD	0,13	0,27	<LOD	<LOD	<LOD
Miricetina	<LOD	0,09	0,05	0,07	1,98	2,49	2,49
Quercetina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido Cinâmico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kaempferol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Total (soma dos compostos fenólicos)	6,94	17,01	13,25	14,92	25,13	15,11	19,51

Fonte: Elaborado pela autora, 2022

Figura 20. Cromatograma obtido por HPLC para o tratamento controle. Picos: ácido gálico, galocatequina, ácido 3,4-dihidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido elágico (vermelho = 255 nm); 2-(4-hidroxifenil)etanol, epicatequina (marrom = 280 nm); ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido sinápico (verde = 320 nm); rutina, miricetina (lilás = 360 nm).



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.4.4 Características Sensoriais

Na análise de componentes principais, os dois primeiros componentes representaram 78,1% da variação obtida (46,1% para a componente principal 1 e 32,0 % para a componente principal 2) permitindo a análise conjunta das variáveis e dos tratamentos em um gráfico bidimensional (Figura 15).

O painel sensorial diferenciou as amostras em principalmente 4 grupos. De acordo com a Dimensão 1, há uma associação positiva entre as variáveis estabilidade da espuma, consistência da espuma e carbonatação com os tratamentos Imp2, Imp8, Bra2, Bra8 e Bra4 uma vez que os mesmos estão à direita do gráfico. Consegue-se observar uma diferenciação em três principais grupos entre esses tratamentos, sendo que, de acordo com os julgadores, 4 g/L do lúpulo brasileiro (Grupo I) “Comet” durante o *dry hopping*, proporcionou os maiores valores para as características acima citadas.

O Grupo III (Imp2) apresentou valores médios de acidez, estabilidade da espuma, consistência da espuma e carbonatação em comparação com os tratamentos do Grupo I, II e IV. Nesse grupo, observou-se os menores valores para as variáveis alocadas na Dimensão 2 (álcool, amargor e corpo) devido à sua posição mais abaixo no gráfico, se comparado com os demais.

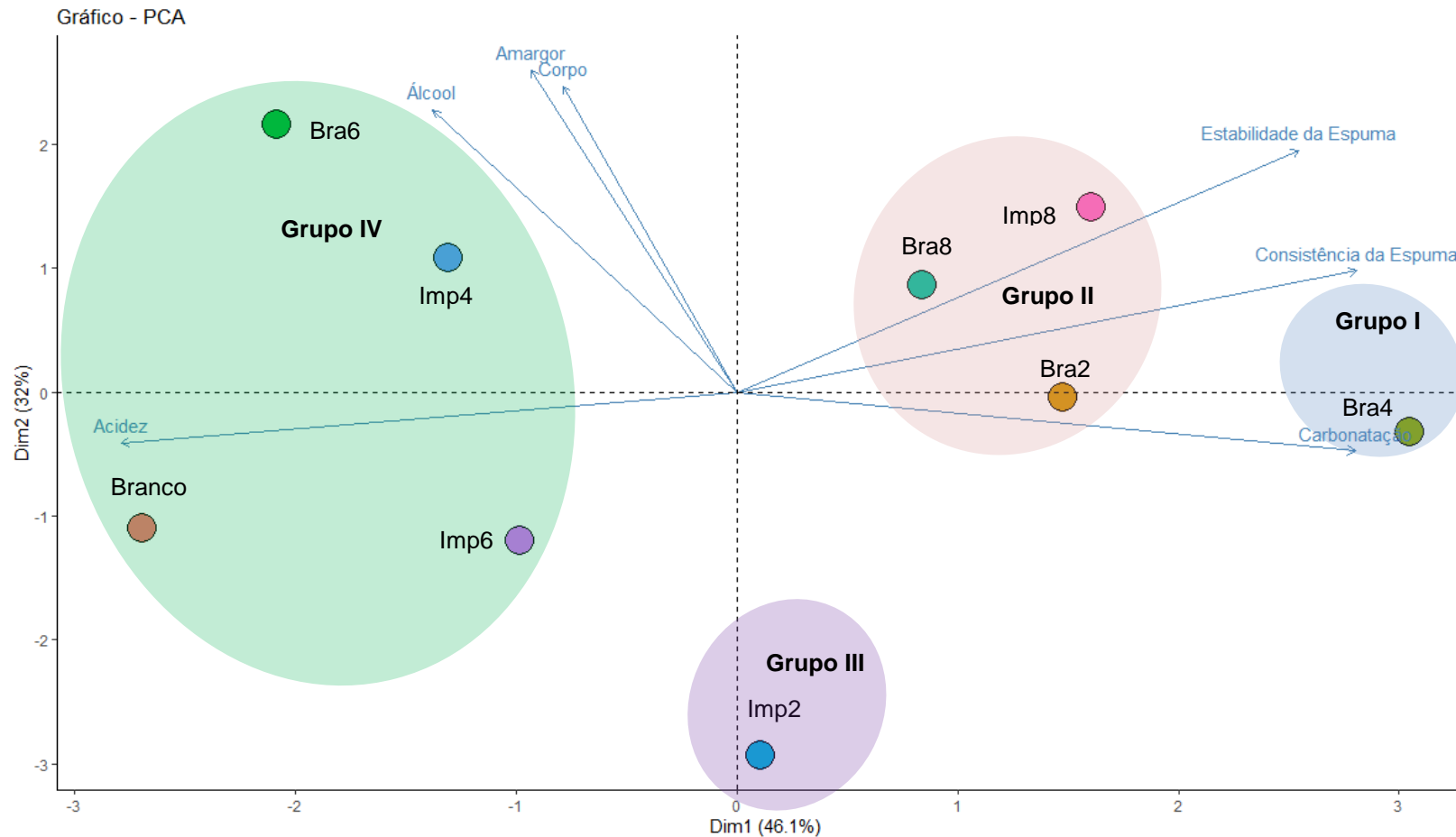
De acordo com os julgadores, os tratamentos do Grupo IV foram os que apresentaram os maiores valores para a acidez das cervejas. Esses tratamentos apresentaram correlação negativa com as variáveis posicionadas à direita do gráfico (Dimensão 1). A principal diferença observada entre os tratamentos do grupo IV é que Imp4 e Bra6 apresentaram maiores valores de amargor, álcool e corpo do que se comparado ao Branco e Imp6.

Visto que as variáveis álcool, amargor e corpo pertencem à Dimensão 2, os tratamentos posicionados mais acima do gráfico apresentam maiores valores para essas variáveis. A adição de 2 g L⁻¹ de lúpulo importado diminuiu os valores de sabor alcoólico na bebida, visto que, correlaciona-se negativamente com esta variável.

Os resultados referentes à variável amargor estão de acordo com os obtidos na avaliação química, em que a adição de maiores quantidades de lúpulo, para

ambas as origens fez com que as cervejas apresentassem maiores unidades de amargor. O painel sensorial descreveu as cervejas com amargor entre médio e forte aquelas em que foram adicionados 6 e 8 g L⁻¹ do lúpulo brasileiro e 4 e 8 g L⁻¹ do lúpulo importado no *dry hopping*. Diferentemente da análise físico-química do amargor, a qual é determinada apenas pelos iso- α -ácidos da cerveja, a análise sensorial pode englobar muitos outros compostos oriundos principalmente do lúpulo, como os polifenóis, que interferem no gosto amargo da cerveja. As cervejas Bra6 e Bra8, descritas com o amargor médio e forte, foram as que apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais de acordo com as análises químicas. McLaughlin *et al.*, (2008) verificaram que à medida que os níveis de fenólicos aumentavam, o amargor produzido era avaliado sensorialmente como mais “duro” e a cerveja também se mostrava mais adstringente (possivelmente devido a ação de fenólicos com a propriedade de precipitar as proteínas da saliva).

Figura 21. Análise dos componentes principais (ACP) para as variáveis: amargor; acidez; álcool; corpo; estabilidade da espuma; consistência da espuma e carbonatação julgadas pelo painel sensorial em cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.



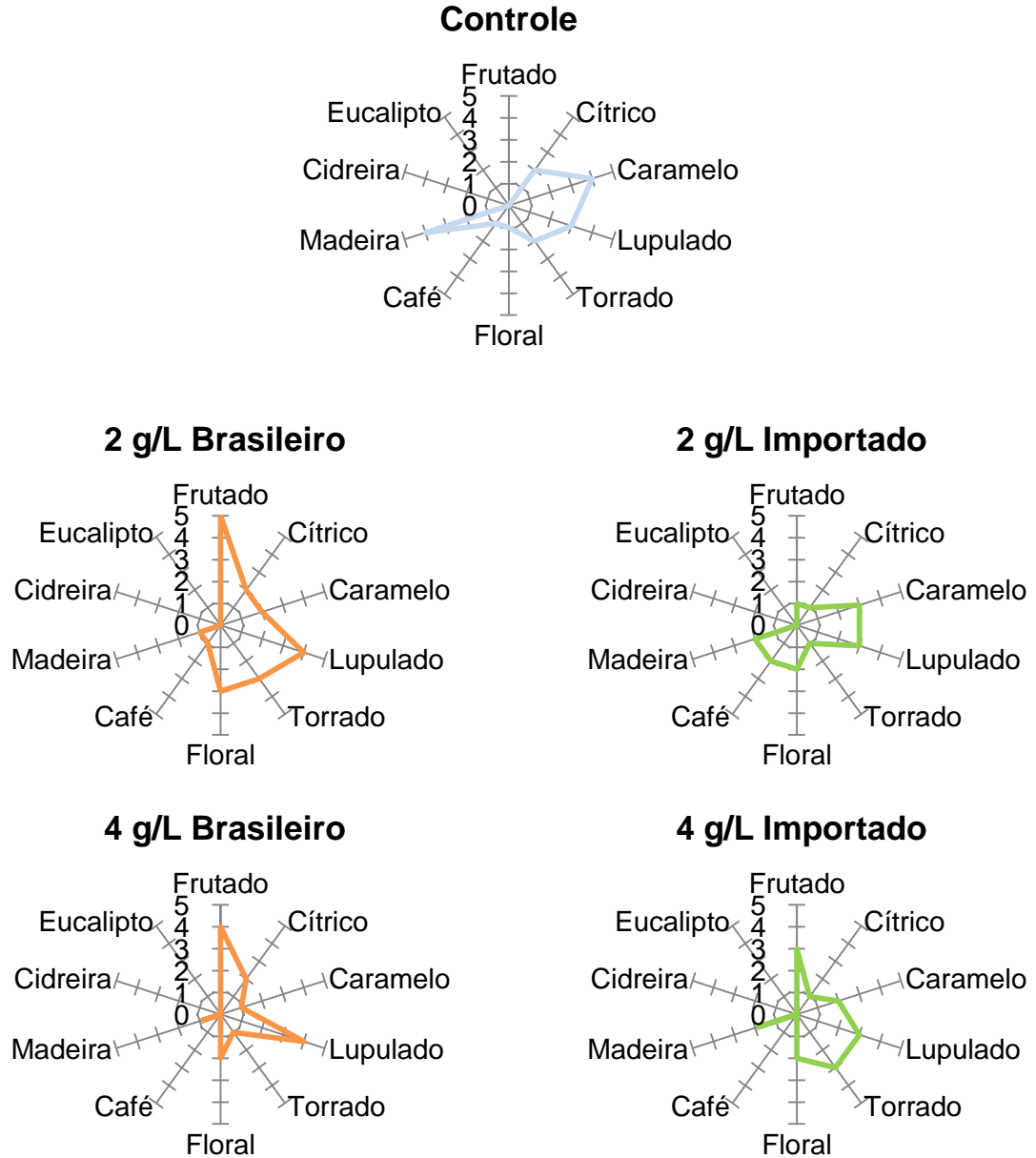
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

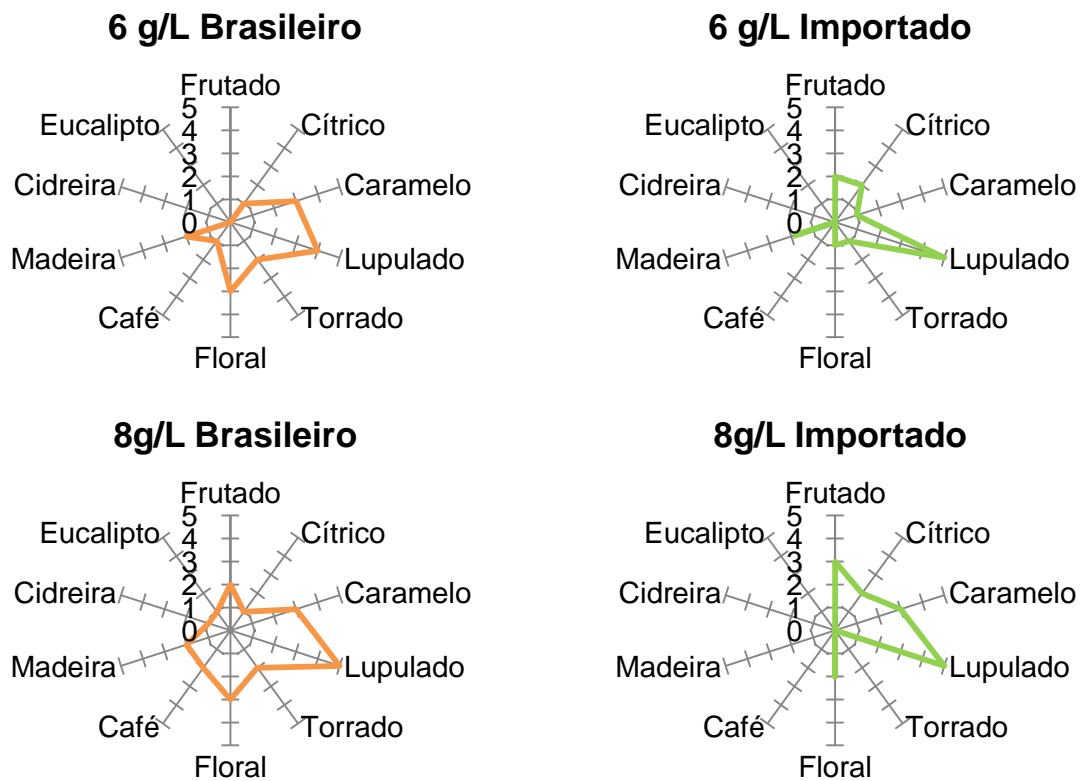
A adição de lúpulo na etapa de maturação reduziu as intensidades de aromas amadeirados e de caramelo nas cervejas. As curvas aromáticas mostraram predominância de aromas frutados nos tratamentos Bra2 e Bra4 e lupulados nos tratamentos Bra2, Bra4, Bra6, Bra8, Imp6 e Imp8 em relação aos demais atributos avaliados indicando que as cervejas foram influenciadas pela adição de lúpulo já que obtiveram médias de até cinco pontos superiores ao controle. No tratamento Bra8 surgiram diferentes notas aromáticas: capim cidreira e eucalipto, indicando uma possível tendência de *terroir*, o que pode representar uma vantagem competitiva para o lúpulo brasileiro ao promover uma experiência diferenciada aos consumidores (Figura 17).

A percepção de aromas frutados foi superior nos tratamentos Bra2 e Bra4 em comparação com as mesmas concentrações com o uso do cultivar importado. Em contrapartida, as maiores concentrações de lúpulo importado (6 e 8 g L⁻¹) adicionado ao *dry hopping* apresentaram maior intensidade de aromas frutados do que se comparado as mesmas concentrações utilizadas com o lúpulo brasileiro. O mesmo comportamento foi observado com o aroma cítrico. Isto indica que menores concentrações de lúpulo brasileiro no *dry hopping* proporcionaram aromas cítricos equivalentes e aromas frutados superiores as maiores concentrações do importado, possibilitando a diminuição dos custos de produção das cervejarias.

Com exceção da concentração de 4 g L⁻¹ de lúpulo brasileiro, as demais concentrações adicionadas apresentaram maiores percepções de aromas florais do que se comparado com o lúpulo importado. As cervejas produzidas com o lúpulo Comet possuem aromas frutados e florais, sendo o composto aromático geraniol encontrado predominantemente (TAKOI *et al.*, 2017). Diferentes teores de geraniol foram adicionados em cervejas com pequenas quantidades desse composto, sendo que, os perfis sensoriais mostram que a adição de geraniol em teores ligeiramente maiores do que os presentes na cerveja aumentaram significativamente os atributos aromáticos florais e cítricos, confirmando o importante papel desse volátil no aroma da cerveja (HASLBECK *et al.*, 2018). O resultado está relacionado com a adição do lúpulo brasileiro, que diante da análise de compostos voláteis, apresentou maiores picos de áreas de geraniol do que se comparado ao lúpulo importado para esse composto.

Figura 22. Perfil aromático julgado pelo painel sensorial em cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.





Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Podem ser encontradas diferenças de *terroir* entre o mesmo cultivar de lúpulo proveniente de lugares distintos. O *Terroir* é um conceito de grande importância na atividade vitivinícola, e indica os vinhos podem adquirir características únicas dependendo do manejo e das condições naturais do meio em que a videira é cultivada.

5.5 CONCLUSÕES

O lúpulo Comet brasileiro adicionado na etapa de *dry hopping* na concentração de 8 gramas L⁻¹ é indicado visando a obtenção de um produto com maiores concentrações de compostos bioativos, compostos voláteis e diferentes notas aromáticas identificadas pelo painel sensorial.

As cervejas produzidas com lúpulo brasileiro, independente da concentração, associaram-se positivamente com os compostos ácido sinápico, rutina e ácido p-cumárico. Os compostos miricetina, ácido vanílico e ácido 3,4 dihidroxibenzoico apresentaram correlação positiva com as cervejas adicionadas de lúpulo importado.

6 ANÁLISE MULTIVARIADA PARA ESTUDAR A RELAÇÃO ENTRE A CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE CERVEJAS E O CONTEÚDO DE ALFA-ÁCIDOS PRESENTE EM DOIS CULTIVARES DE *Humulus lupulus* L. E PERFIL DE COMPOSTOS VOLÁTEIS DAS BEBIDAS

6.1 RESUMO

À medida que as pesquisas sobre cervejas avançam, resultados demonstram que o consumo da bebida produz benefícios significativos para a saúde, sendo principalmente atribuídos à alta concentração de polifenóis. Além disso, há muito interesse na variabilidade aromática das cervejas e uma série de estudos concentram-se nos seus perfis químicos. Desta forma, o objetivo deste estudo foi explorar a relação entre o teor de alfa ácidos de dois cultivares de lúpulo produzidos no Brasil e importado com as características da cerveja, além de estudar o perfil aromático das bebidas. O trabalho foi desenvolvido na UDESC/CAV, em Lages/SC, no ano de 2021. Uma cerveja padrão do estilo *Indian Pale Ale*, com a mesma receita base, foi produzida. Cada tratamento consistiu na adição de diferentes cultivares de lúpulo (Comet e Fuggle) de duas diferentes origens (brasileiro e importado). Houve uma correlação inversa entre o teor de alfa ácidos e o conteúdo fenólico e capacidade antioxidante das cervejas. As cervejas em que foi utilizado lúpulo Fuggle brasileiro, com o menor teor de alfa ácidos dentre os avaliados, apresentaram maior associação positiva com o conteúdo de polifenóis totais e individuais e capacidade antioxidante. Em torno de 30 compostos voláteis foram identificados nas amostras de cervejas, os quais foram separados em quatro grupos. Houve uma associação positiva das cervejas produzidas com o lúpulo importado, em ambos os cultivares utilizados, com os seguintes grupos de compostos voláteis: álcoois, ésteres e cetonas. Observou-se uma associação positiva das cervejas produzidas com lúpulo Comet, em ambas as origens, com o grupo dos terpenos, indicando maiores teores desses compostos em comparação com a utilização do lúpulo Fuggle. Como conclusão, as cervejas produzidas com o cultivar Fuggle Brasileiro possuem maior acúmulo de substâncias antioxidantes. Os resultados confirmam que os cultivares e a origem do lúpulo influenciam no perfil aromático das cervejas produzidas.

Palavras-Chave: antioxidantes, lúpulo, polifenóis

6.2 INTRODUÇÃO

O lúpulo, planta trepadeira e perene, é utilizado desde os tempos antigos como medicina tradicional (LIU *et al.*, 2015, KIM *et al.*, 2016). Possui efeito positivo na cerveja, sendo que, essa matéria prima é utilizada não apenas para conferir amargor à bebida, mas também aroma e aumento na atividade antioxidante e antimicrobiana devido às propriedades organolépticas derivadas de ácidos orgânicos amargos, óleos essenciais, resinas e compostos polifenólicos (CERMAK *et al.*, 2015). Essas características são conferidas pelas glândulas de lupulina que só podem ser secretadas pelos cones de plantas femininas de *Humulus lupulus* L. (NTOURTOGLOU *et al.*, 2020).

Nos últimos anos, a cerveja tornou-se reconhecida como um produto altamente fenólico, sendo que a maioria dos polifenóis são derivados da cevada e cerca de 30% oriundos do lúpulo (QUIFER-RADA *et al.*, 2015). Vários estudos têm mostrado a importância do teor de polifenóis na cerveja, levando ao reconhecimento desta bebida como apresentando benefícios à saúde semelhantes aos do vinho (ARRANZ *et al.*, 2012). Como o lúpulo possui um conteúdo fenólico único, principalmente devido à presença de xantohumol e outros flavonoides prenilados, a cerveja apresenta potencial para fornecer esses compostos específicos através da ingestão da bebida (ELROD *et al.*, 2019).

O conteúdo fenólico na cerveja pode variar de acordo com o estilo, método de fabricação, cultivar de lúpulo, local de cultivo e condições climáticas durante o crescimento do lúpulo (KROFTA *et al.*, 2008; GRANATO *et al.*, 2011; ELROD *et al.*, 2017). Cada cultivar de lúpulo apresenta um teor específico de alfa ácidos, que está associado à quantidade e ao tipo de compostos amargos contidos nas glândulas de lupulina, sendo que, uma maior quantidade de alfa ácidos indica um sabor mais amargo devido à presença de compostos como humulona, cohumulona e adhumulona (NICKERSON, 1986). Como a cerveja é a principal fonte alimentar dos polifenóis presentes no lúpulo, uma maior compreensão do efeito de cada cultivar e origem do lúpulo na produção da bebida, ajudariam os consumidores interessados nos benefícios relacionados à ingestão de cerveja na escolha de cada produto.

Uma grande variedade de sabores e aromas podem ser introduzidos nas cervejas devido à disponibilidade de até 250 variedades de lúpulo (BIENDL *et al.*, 2014). Diferenças na composição química de cada cultivar de lúpulo irá conferir

características distintas de sabor e aroma à cerveja (ALMEIDA *et al.*, 2019; YAN *et al.*, 2019).

A fração volátil da cerveja pode ser composta por mais de 800 compostos, mas apenas algumas dezenas destes podem estar diretamente envolvidos na produção de uma sensação de aroma quando o produto é consumido, e devem ser considerados para fins de diferenciação (PALAMAND; ALDENHOF, 1973). Esses compostos pertencem a várias classes químicas, incluindo álcoois superiores, ésteres, ácidos graxos, compostos carbonílicos, compostos de enxofre, compostos furânicos, monoterpenóis, C 13 -norisoprenoides e fenóis voláteis (RODRIGUES *et al.*, 2008; APREA *et al.*, 2015).

Neste sentido, o objetivo deste estudo foi explorar a relação entre o teor de alfa ácidos de dois cultivares de lúpulo (Comet e Fuggle) com distintas origens (Brasileiro e Importado) nas características químicas das cervejas.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Processamento da cerveja artesanal

As cervejas foram produzidas no Núcleo de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV) em Lages/SC no ano de 2021.

A bebida foi preparada de forma artesanal, com o auxílio de painéis automáticas em aço inox 304 com capacidade total de 30 litros cada uma, em sistema Single Vessel, que possibilita a brassagem e a fervura do mosto em um único equipamento.

No total, foram produzidos 40 litros de cerveja através da mistura de 10 kg de malte *Pale* com 32 litros de água sob temperatura controlada de 67°C. A mistura foi mantida em cozimento durante 60 minutos, e após, o mosto foi aquecido a 76°C durante 10 minutos na etapa de *mash-out*. Em seguida, os grãos de malte foram separados do mosto líquido e foi realizado a lavagem dos grãos com 28 litros de água a 76°C. A fervura foi realizada separadamente, durante 60 minutos, de acordo com os tratamentos. Cada tratamento consistiu na adição de dois cultivares de lúpulo de duas diferentes origens. O esquema experimental, com os cultivares, origens e quantidades de lúpulo utilizados, está exemplificado na Tabela 5.

Tabela 5. Diferentes cervejas produzidas através da variação da origem do lúpulo “Comet” e “Fuggle”.

Código da amostra	Cultivar	Origem	60 min	20 min	0 min
CoBra	Comet	Brasileiro	13,5 g	8 g	8 g
Colmp	Comet	Importado	13,5 g	8 g	8 g
FuBra	Fuggle	Brasileiro	13,5 g	8 g	8 g
FugImp	Fuggle	Importado	13,5 g	8 g	8 g

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Em seguida, o mosto foi resfriado com um trocador de calor denominado *chiller* de imersão até atingir uma temperatura final de 24°C. Cada tratamento foi colocado em um fermentador cônico de aço inox, totalizando 10 litros em cada um dos equipamentos, e foi colocado para fermentar em uma sala acondicionada a 18°C durante 7 dias, utilizando a levedura Fermentis US-05 em uma concentração de 0,6 g/L. Em seguida, os fermentadores foram transferidos para câmara fria a 0°C para que se desse início à etapa de maturação.

6.3.2 Alfa ácidos do lúpulo

Para a determinação dos alfa ácidos dos lúpulos foi utilizada a metodologia desenvolvida por Haley et al. (2012). Uma amostra de 3 g de lúpulo seco foi obtida através da moagem do material com auxílio de uma cadinho. Uma quantia de 2,5 g do lúpulo moído foi colocado em um béquer de 100 mL e adicionado 50 mL de metanol. Após, essa mistura foi agitada durante 30 minutos à temperatura ambiente. A mistura foi então deixada em repouso por 10 min, para o material particulado assentar e em seguida foi realizada a filtragem em papel filtro qualitativo para remover o material particulado. Uma alíquota de 0,05 mL do filtrado foi colocado em um balão volumétrico de 25 mL e o frasco foi preenchido com NaOH metanólico (0,5 mL de NaOH 6N em 250 mL de metanol). Uma alíquota desta solução foi então colocada em uma cubeta de quartzo e avaliada no espectro UV visível, usando de branco de 0,05 µL de metanol em 25 mL de NaOH metanólico. Foram obtidos os valores de absorbância para os três comprimentos de onda principais de 275, 325 e 355 nm. Três equações, com três incógnitas, foram usadas para descrever o sistema:

$$A_{355} = 31.8 C_{\alpha} + 46.0 C_{\beta} + 1.0 C_{\text{comp3}}$$

$$A_{325} = 38.1 C_{\alpha} + 33.1 C_{\beta} + 1.5 C_{\text{comp3}}$$

$$A_{275} = 9.0 C_{\alpha} + 3.7 C_{\beta} + 3.1 C_{\text{comp3}}$$

Onde A_{355} , A_{325} e A_{275} são as absorvâncias nos três comprimentos de onda e C_{α} , C_{β} e C_{comp3} são as concentrações (em g/L) dos α -ácidos, β -ácidos e o terceiro componente, respectivamente.

6.3.3 Características químicas

a) Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Singleton & Rossi (1965) com modificações realizadas por Zhao et al. (2010). Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, a 0,5 mL da amostra de cerveja diluída (1:20), adicionou-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de Na_2CO_3 a 7,5%. O tubo de ensaio foi incubado por 5 min em Banho-Maria a 50°C. Após 15 minutos de repouso, o complexo azul formado foi quantificado em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 760 nm. A medição foi então comparada com uma curva padrão de ácido gálico ($y=9,2867x + 0,0259 // R^2=0,9972$) e o resultado expresso em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por litro de cerveja (mg GAE L^{-1}).

b) Flavonoides

Os flavonoides foram determinados de acordo com a metodologia proposta por MEDA *et al.*, 2005, com adaptações. A determinação foi realizada por espectrofotometria, com leitura realizada na faixa de absorvância de 415 nm. Em tubos de ensaio, colocou-se 2 mL da amostra diluída (1:1) e acrescentou-se 2 mL de cloreto de alumínio à 2% em metanol. Após 30 minutos de repouso, as leituras foram realizadas. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração ($y= 14,765x + 0,0488 // R^2 = 0,9983$) usando o padrão quercetina e os resultados foram expressos em mg de quercetina por litro de cerveja (mg QE L^{-1}).

c) Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das cervejas foi determinada pela metodologia baseada na determinação da atividade antioxidante total pelo método de redução do ferro -

FRAP (RUFINO et al., 2006). O reagente FRAP foi preparado no dia da análise e utilizado imediatamente, através da mistura de 25 mL do tampão de acetato (0,3 M), 2,5 mL da solução TPTZ (10 mM) e 2,5 mL de uma solução de cloreto de ferro (20 mM). Para tubos de ensaio foi transferida uma alíquota de 0,09 mL da bebida, 2,7 mL do reagente FRAP e 2,7 L de água destilada. A mistura foi homogeneizada e os tubos mantidos em banho maria à 37°C durante 30 minutos. Após, a absorbância foi quantificada no comprimento de onda de 595 nm, onde foi utilizado o reagente FRAP para calibração do espectrofotômetro. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração usando o padrão Trolox e os resultados foram expressos em mg de Trolox por litro de cerveja (mg Trolox L^{-1}).

d) Proteínas

A quantificação de proteínas foi realizada baseada na metodologia proposta por Gornall *et al.*, (1949). Foram adicionados em tubos de ensaio 0,5 mL da amostra de cerveja (diluição de 1:1) e 5 mL do reagente de biureto. Agitou-se os tubos com auxílio de um vórtex de bancada e em seguida os tubos foram deixados em repouso por 30 minutos. Logo após, realizou-se a leitura no comprimento de onda de 540 nm. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração ($0,0215x + 0,0489 // R^2 = 99,79$) usando o padrão caseína e os resultados foram expressos em mg de caseína por litro de cerveja (mg QE L^{-1}).

e) pH

O pH foi determinado pelo método eletrométrico utilizando um pHmetro de bancada (calibrado com as soluções padrão antes do uso), sendo medido em amostras de 10 ml de cerveja (EBC, 2005).

f) Acidez Total

Foi determinada pelo método de titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 N (padronizada com biftalato de potássio), utilizando-se como indicador solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Foram pipetados 5 mL de amostra e 5 mL de água destilada em um béquer e titulado a solução de hidróxido de sódio até o ponto de viragem (EBC, 2005).

A acidez total foi expressa em meq L⁻¹, de acordo com a fórmula: Acidez Total (meq L⁻¹) = (1000 x n x NNaOH)/v, onde: n = volume da solução de NaOH gasto na titulação (mL); N = Normalidade da solução de NaOH; v = Volume da amostra (mL).

g) Sólidos Solúveis Totais

Os sólidos solúveis totais foram quantificados através de leitura direta em refratômetro portátil digital, previamente calibrado com água destilada, com valor corrigido a 20°C e os resultados expressos em °Brix (EBC, 2005).

h) Açúcares Redutores

A metodologia utilizada para determinar a quantidade de açúcares redutores é descrita pelo Instituto Adolfo Lutz (2008). Pipetou-se 5 mL da amostra degaseificada para um balão volumétrico de 100 mL e completou-o com a solução de *Fehling*. Levou-se a amostra à fervura e titulou-se, gota a gota, a amostra contida na bureta para o erlenmeyer. Ao início da titulação, observou-se uma cor azul intensa que ao mudar de coloração foi acrescentado uma gota de azul de metileno (1%) e continuou-se a titulação até o desaparecimento da coloração azul e o surgimento da cor avermelhada indicando o ponto de viragem

i) Amargor

A análise dos níveis de amargor nas cervejas foi realizada de acordo com a Analytica EBC, 2010. Uma amostra de cerveja degaseificada (10 mL) foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL. Em seguida, adicionou-se uma solução de HCl 6 N (0,5 mL) e isooctano (20 mL) e as amostras foram agitadas por 30 minutos. Logo após, a amostra foi centrifugada em recipientes Falcon (5 minutos, 3000 rpm). Em seguida, uma amostra foi retirada da camada de isooctano e determinada com um espectrofotômetro em um comprimento de onda de 275 nm. O isooctano puro foi a amostra de referência. O amargor foi calculado de acordo com a fórmula: IBU= 50*A (IBU—unidades de amargor; A—absorbância a 275 nm).

6.3.4 Compostos Fenólicos Individuais

As amostras de cerveja foram analisadas quanto à composição fenólica usando um equipamento de HPLC (Agilent 1260, Agilent Technologies) acoplado a

uma coluna de fase reversa (HPLC Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 μm) e Diode-Array Detector. As amostras foram filtradas (0,45 μm , filtros de seringa de nylon, 15 mm, tecnologias Agilent, Alemanha) antes da injeção. O sistema solvente foi baseado em 0,2% de ácido acético em água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) e 0,2% de ácido acético em MeOH puro (grau HPLC, Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase A e B, respectivamente. Para a separação cromatográfica foi utilizado 1% de B por 2 min, depois de 1 a 20% em 4 min e de 20 a 30% em 4 min, que foi mantido em 30% por 5 min. Em seguida, o solvente foi trocado de 30 para 50% em 5 minutos e mantido por mais 5 minutos. Um gradiente de 50 a 100% de B foi estabelecido em 5 min com 5 min de espera. Então, o solvente B voltou a 1% em 2 min com 3 min de espera antes da próxima injeção. O tempo total de análise foi de 40 minutos. A taxa de fluxo foi de 0,8 mL min⁻¹, o volume de injeção foi de 5 μL e o compartimento da coluna foi de 30 °C. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando uma curva de calibração de cada padrão. O método HPLC foi validado determinando a linearidade da curva de calibração, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ). O limite de detecção foi determinado pelo método da relação sinal-ruído.

6.3.5 Análise de Compostos Voláteis

Condições de extração no HS-SPME

Para a extração dos componentes voláteis das amostras foi utilizado metodologia já otimizada, previamente descrita por Alves e colaboradores (2020). Em um vial de 15 mL contendo uma barra de agitação magnética e $0,7500 \pm 0,005$ g de NaCl foi adicionado 7,5 mL de amostra e 20 μL de solução de 4-methyl-2-pentanol (1,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). O vial foi inserido em um recipiente contendo uma jaqueta de vidro o qual estava sobre uma chapa de agitação magnética (XXX) e conectado a um banho termostatizado com circulação de água (SOLAB SL 152, Piracicaba, SP, Brasil). O vial foi mantido em banho de água à $40 \pm 0,2$ °C e o conteúdo foi mantido sob agitação por 5 minutos. A fibra de SPME foi exposta ao headspace do vial o qual foi mantido nessa mesma temperatura por 30 minutos. Foi utilizada fibra de SPME composta por divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane

(DVB/CAR/PDMS) com cobertura de 50/30 μm de espessura e 1 cm de comprimento (SUPELCO, Bellefonte, PA, USA).

Condições do GCMS

A fibra de SPME contendo os componentes voláteis adsorvidos foi manualmente inserida no injetor do GCMS à 250 °C (modo splitless; equipado com liner de vidro, 0,75 mm I.D.) e mantido por 5 minutos. Os componentes desorvidos foram separados em um Agilent 7890A GCMS usando metodologia adaptada de Benucci e colaboradores (2021). Uma coluna Agilent HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) composta por 95% dimethyl/5% diphenyl polysiloxane foi utilizada com fluxo de gás Hélio de 1,0 ml min⁻¹. A temperatura do forno foi mantida à 40 °C por 5 min seguida de rampa de aquecimento de 40 a 260 °C com taxa de aquecimento de 9 °C min⁻¹. As temperaturas da interface e da fonte de íons foram configuradas a 300 °C. Os dados foram adquiridos no modo Full Scan com faixa de 30 – 400 m/z. O espectrômetro de massas foi operado com impacto de elétrons a 70 eV. Cada amostra foi analisada em triplicata. Os picos foram integrados manualmente em software G1701EA GC/MSD Chemstation. As substâncias voláteis foram caracterizadas através da comparação do espectro de massas e do índice de Kovats (KI) experimental para cada componente com os respectivos espectros de massas e índices de Kovats de padrões descritos por Adams (2007). Os valores de KI experimentais foram obtidos a partir da injeção de uma amostra de hidrocarbonetos saturados C7-C30 (Sigma-Aldrich) nas mesmas condições utilizadas para as amostras e calculados de acordo com van den Dool and Kratz (van Den Dool & Kratz, 1963).

6.3.6 Análise dos Dados

Os dados de percentual de alfa ácidos do lúpulo foram submetidos à análise de variância e quando significativos pelo teste F foram comparados pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro. O tratamento dos demais dados obtidos foi realizado com base na análise multivariada através da análise de componentes principais a qual fornece informações importantes sobre a estrutura do conjunto de dados. A análise estatística foi realizada com auxílio do programa R com o objetivo de separar os tratamentos em diferentes grupos (R CORE TEAM, 2013).

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.4.1 Relação entre o teor de alfa ácidos do lúpulo e as características químicas da cerveja

A Figura 18 mostra as variâncias das duas primeiras componentes, as quais explicam 93,9% do total de informações do modelo (79,2% explicada pela primeira componente e 14,7% explicada pela segunda componente), bem como as cargas responsáveis por essa separação.

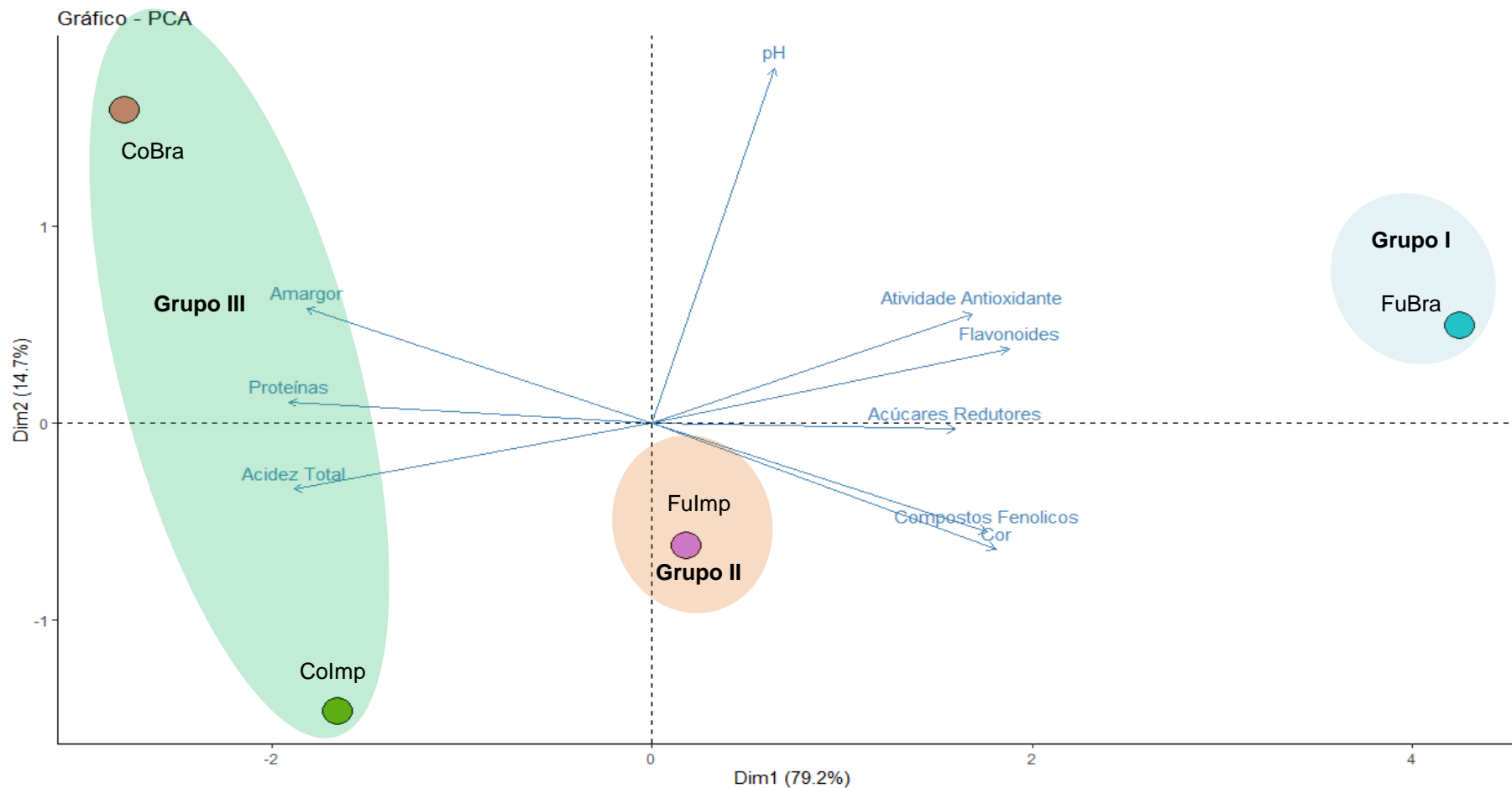
De acordo com a dimensão 1, fica evidente a separação das cervejas dependendo do cultivar utilizado no processo de produção, com Fuggle à direita e Comet à esquerda do gráfico. Pela observação das cargas das variáveis responsáveis pela separação entre os cultivares utilizados, há maior associação positiva do cultivar Fuggle brasileiro (Grupo I) com as variáveis: atividade antioxidante, flavonoides, açúcares redutores, compostos fenólicos totais e cor, do que se comparado com o uso do mesmo cultivar importado (Grupo II).

Os tratamentos do Grupo III, compostos pelo cultivar Comet em ambas as origens, estão associados positivamente às variáveis amargor, proteínas e acidez total, diferenciados basicamente pelo maior pH observado nas cervejas produzidas o cultivar Comet brasileiro em comparação com o importado.

O Grupo II, formado pelo cultivar Fuggle importado, apresenta valores intermediários entre os grupos I e III para as variáveis pertencentes à dimensão 1.

A dimensão 2 mostra a separação das amostras em relação a origem do lúpulo, com as cervejas produzidas com lúpulo brasileiro na região superior do gráfico e aquelas produzidas com lúpulo importado na região inferior. A associação neste caso é com a variável pH, onde, as cervejas produzidas com lúpulo brasileiro apresentaram maiores valores dessa variável.

Figura 23. Análise de componentes principais (PCA) para as variáveis: amargor; proteínas; acidez total; pH; atividade antioxidante; flavonoides; compostos fenólicos totais; açúcares redutores e cor utilizando lúpulo “Comet” ou “Fuggle” importado ou brasileiro na produção de cervejas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

O teor de alfa-ácidos dos diferentes cultivares e origens de lúpulo estão listados na Tabela 6. A porcentagem de alfa ácidos variou de 2,29 % (Fuggle Brasileiro) à 12,46% (Comet Importado).

Tabela 6. Quantidade de alfa-ácidos em cada cultivar e origem de lúpulo determinados por espectrofotometria.

Cultivar e Origem	Percentual de Alfa-ácidos
Comet Brasileiro	11,89 b
Comet Importado	12,46 a
Fuggle Brasileiro	2,29 d
Fuggle Importado	6,47 c
CV (%)	6,39

*Médias seguidas da mesma letra, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

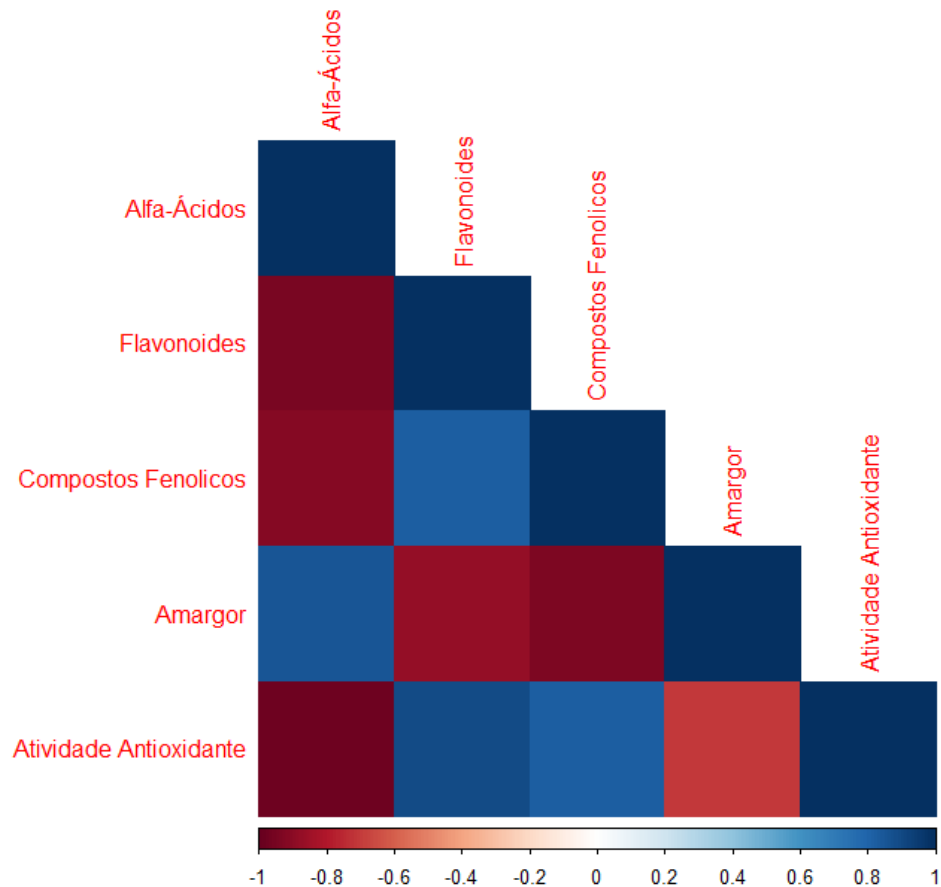
Existe uma correlação negativa entre o conteúdo de alfa-ácidos dos cultivares com as variáveis compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e flavonoides (Figura 19). As cervejas em que os lúpulos com menores percentuais de alfa-ácidos foram utilizados apresentaram maiores valores de compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e flavonoides. O resultado está de acordo com o encontrado por Elrod et al. (2019) que ao analisar a relação entre o teor de compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e o conteúdo de alfa-ácidos do lúpulo verificaram que os cultivares com menores valores de alfa-ácidos apresentaram maiores concentrações de compostos fenólicos totais e de atividade antioxidante.

Em contrapartida, há uma correlação positiva entre o teor de alfa-ácidos com o amargor das cervejas. O amargor é um indicador de ácidos em solução e essas características indicam um aumento no número de prótons livres. Portanto, menores teores de alfa ácidos possuem maior potencial antioxidante, visto que, apresentam menos cargas livres em solução (ELROD *et al.*, 2019). Com base nisso, sugere-se que determinados cultivares de lúpulo podem ser mais benéficos do que outros na produção das cervejas visando maiores concentrações de polifenóis e atividade antioxidante.

Os maiores valores de amargor encontrados nas cervejas produzidas com o cultivar Comet, independente da origem (Grupo III) estão relacionados com a

quantificação da maior quantidade de alfa ácidos (Tabela 6), os quais conferem à bebida o amargor necessário (MIKYŠKA; KROFTA, 2012). A quantidade de alfa-ácidos presente no cultivar Fuggle Brasileiro (2,47%) está abaixo do mínimo para a variedade. Esse valor não impede o seu uso, apenas será necessário utilizar uma quantidade de lúpulo superior para fornecer amargor para a cerveja.

Figura 24. Correlação para as variáveis: amargor; alfa-ácidos; flavonoides; compostos fenólicos totais; atividade antioxidante e amargor em cervejas produzidas com dois cultivares de lúpulo provenientes de duas regiões.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A Tabela 7 mostra o comprimento de onda, o tempo de retenção, a equação da reta, o R^2 , o limite de detecção e o limite de quantificação para os 18 compostos identificados na cerveja via cromatografia líquida de alta eficiência. Os resultados confirmam um excelente coeficiente de determinação para todos os compostos.

Para a análise de componentes principais, foram escolhidas duas componentes, com base em uma variância acumulada de 85,3%. O Gráfico foi construído com os compostos mais relevantes para determinar as diferenças entre os cultivares (Comet e Fuggle) e origens (brasileiro e importado) do lúpulo.

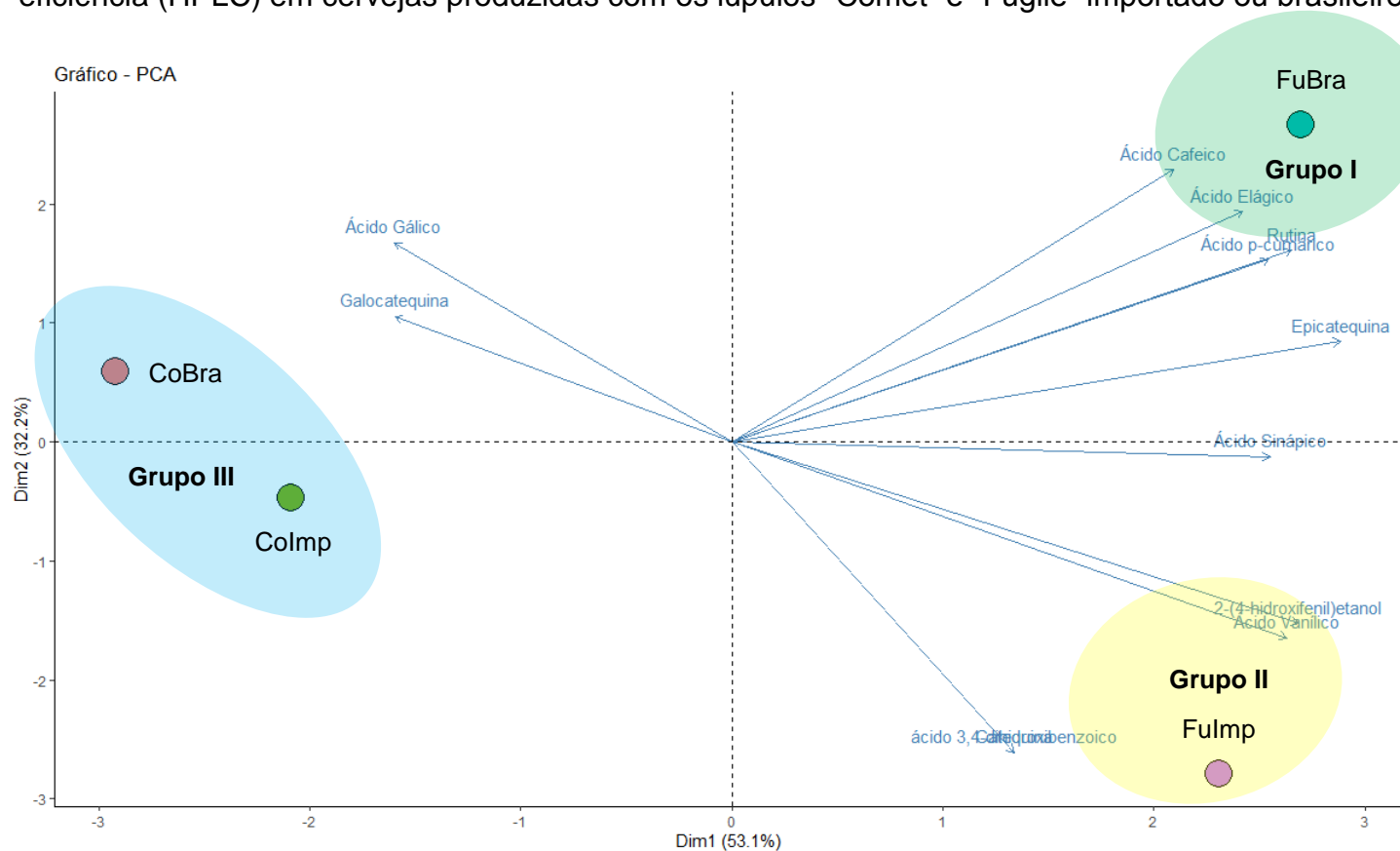
A Figura 20 mostra as variâncias das duas primeiras componentes, que explicam 85,3% do total de informações do modelo, sendo 53,1 % explicada pela primeira componente e 32,2% explicada pela segunda componente.

Tabela 7. Comprimento de onda, tempo de retenção, equação da reta, R², limite de detecção e limite de quantificação para os 18 compostos identificados na cerveja produzida com diferentes cultivares de lúpulo (Fuggle e Comet) provenientes de diferentes locais de cultivo (importado e brasileiro).

Número do Composto	Polifenol	λ (nm)	TR (min)	Equação da reta	R ²	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
1	Ácido Gálico	255	5,979	$y = 1550159,55x + 627914,51$	0,9980	0,000669	0,00668571
2	Galocatequina	255	8,130	$y = 162492x + 72412$	0,9962	0,012275	0,12274591
3	Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	255	8,567	$y = 2402217,95 + 1081177,78$	0,9993	0,000384	0,00383829
4	2-(4-hidroxifenil)etanol	280	10,601	$y = 901595x + 392289$	0,9979	0,001618	0,01618347
5	Ácido Vanílico	255	12,471	$y = 2825268,59x - 974532,62$	0,9838	0,000420	0,00419602
6	Ácido Cafeico	320	12,705	$y = 4825927,96x + 1960324,51$	0,9973	0,000207	0,00207195
7	Epicatequina	280	13,058	$y = 519655x + 165455$	0,9930	0,001789	0,01788827
8	Ácido Siríngico	280	13,257	$y = 2492983,64x + 1527153,91$	0,9917	0,001180	0,01179772
9	Ácido p-cumarico	320	16,167	$y = 6205117,62x + 2151677,30$	0,9996	0,000323	0,00322888
10	Ácido Sinapínico	320	17,788	$y = 4568685,97x + 1072369$	0,9982	0,000252	0,00252196
11	Ácido Ferúlico	320	18,310	$y = 4154370,57x + 1614583,50$	0,9990	0,000224	0,00223732
12	Miricitrina	360	20,787	$y = 1389801,21x + 570183,28$	0,9983	0,000511	0,00511037
13	Rutina	360	21,580	$y = 1418048,15x + 590214,45$	0,9986	0,001028	0,01027755
14	Ácido Elágico	255	22,160	$y = 2723406,12x + 634171,48$	0,9990	0,000390	0,00389978
15	Miricetina	360	22,651	$y = 2159130,63x + 516689,02$	0,9983	0,000701	0,0070107
16	Quercetina	280	24,673	$y = 6576666,49x + 1853766,32$	0,9993	0,000225	0,00224822
17	Ácido Cinâmico	360	25,608	$y = 2519950,60x + 892064,18$	0,9988	0,000552	0,00551698
18	Kaempferol	360	28,999	$y = 2437818,15x + 977632,71$	0,9990	0,001288	0,01288356

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Figura 25. Análise dos componentes principais (ACP) para os compostos fenólicos caracterizados via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em cervejas produzidas com os lúpulos “Comet” e “Fuggle” importado ou brasileiro



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A componente principal 1 mostra a separação das amostras em relação os cultivares de lúpulo utilizados para a produção das cervejas, sendo que, as cervejas que foram produzidas com o cultivar Fuggle ficaram localizadas no quadrante direito, enquanto que, as que cervejas que foram produzidas com o cultivar Comet localizaram-se no quadrante esquerdo. Isto indica que os compostos voláteis com maiores cargas na dimensão 1 podem ser importantes na distinção entre as cervejas produzidas com o lúpulo Fuggle e o lúpulo Comet.

De acordo com a dimensão 1, há uma associação positiva das cervejas produzidas com o lúpulo Fuggle com os compostos epicatequina, rutina, ácido p-cumárico, ácido elágico, 2-(4-hidroxifenil)etanol, ácido sinápico e ácido vanílico. Há uma diferenciação entre as cervejas produzidas com o cultivar Fuggle importado e o brasileiro, sendo que o Grupo I, composto pelo tratamento Fuggle brasileiro, apresenta concentrações mais elevadas destes compostos em comparação com o Grupo II, composto pelo cultivar Fuggle importado. As cervejas produzidas com o cultivar Comet apresentaram associação negativa com os compostos pertencentes à dimensão 1.

A componente principal 2 mostra a separação das amostras em relação a origem do lúpulo na produção das cervejas, sendo que, as bebidas produzidas com o lúpulo brasileiro ficaram localizadas no quadrante superior do gráfico e aquelas produzidas com o lúpulo importado localizaram-se no quadrante inferior. Os resultados demonstram que os compostos fenólicos com maiores cargas na dimensão 2 podem ser importantes na distinção entre as cervejas produzidas com o lúpulo nacional e o importado.

De acordo com a dimensão 2, há uma associação positiva das cervejas produzidas com lúpulo importado com os compostos ácido 3,4-dihidroxibenzoico e catequina, indicando maiores teores desses compostos. Já os compostos ácido gálico, ácido cafeico e galocatequina apresentaram maiores teores nas cervejas produzidas com o lúpulo brasileiro. As condições de cultivo do lúpulo podem resultar na alteração do perfil fenólico da cerveja e o teor final dos compostos fenólicos em cervejas artesanais depende da seleção das matérias-primas (GASIOR et al., 2020; AMBRA et al., 2021).

Considerando os resultados apresentados na Tabela 8, nota-se que as cervejas produzidas com o lúpulo brasileiro apresentaram concentração fenólica

total mais elevada (soma das concentrações fenólicas individuais de cada composto).

Em geral, a composição e a concentração fenólica das amostras de cerveja apresentaram uma variação conforme a origem do lúpulo. Catequina apresentou concentrações mais altas em todas as amostras analisadas, se comparado com os demais compostos, com concentração de até 152,05 mg L⁻¹ (Tabela 8). O resultado está de acordo com Silva et al. (2021), que ao analisar a presença de compostos fenólicos em cervejas brasileiras encontraram a catequina com componente majoritário. Catequina é um composto de grande importância em diferentes setores industriais, promovendo a saúde do consumidor, prevenindo doenças e prolongando a vida útil do produto (ALONSO-ESTEBAN et al., 2019).

O ácido vanílico e o ácido elágico estiveram presentes nas cervejas produzidas com o lúpulo Fuggle em ambas as origens e esses compostos não foram verificados nas cervejas produzidas com o lúpulo Comet brasileiro ou importado. O ácido cafeico e o ácido p-cumárico foram observados apenas nas cervejas produzidas com o lúpulo Fuggle brasileiro.

A presença dos compostos ácido sirínico, ácido ferúlico, miricitrina, miricetina, quercetina, ácido cinâmico e kaempferol não foi observada em nenhum dos tratamentos analisados.

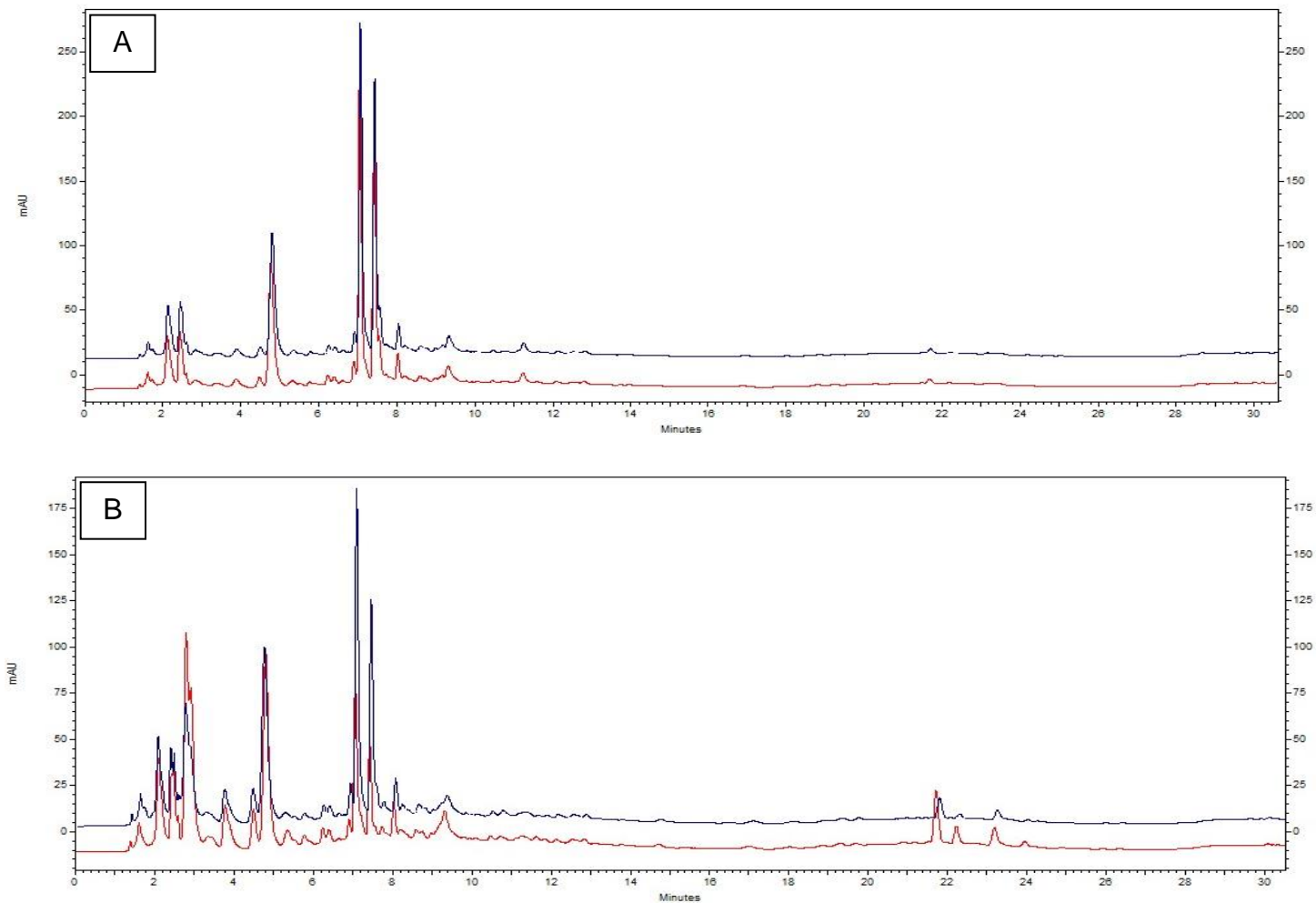
Na Figura 21, estão demonstrados os cromatogramas referentes aos compostos fenólicos individuais identificados no comprimento de onda 255 nm em amostras de cerveja produzidas com diferentes cultivares de lúpulo provenientes de dois locais distintos.

Tabela 8. Concentração (mg L⁻¹) de compostos fenólicos em cervejas produzidas com diferentes cultivares e locais de origem

Compostos Fenólicos	Concentração (mg L ⁻¹)			
	Fuggle Importado	Fuggle Brasileiro	Comet Importado	Comet Brasileiro
Ácido Gálico	1,68	2,23	1,82	3,00
Galocatequina	10,73	14,61	9,10	30,75
Catequina	152,05	89,36	91,30	99,26
Ácido 3,4-dihidroxibenzoico	0,60	0,17	0,18	0,24
2-(4-hidroxifenil)etanol	10,61	5,78	2,04	1,01
Ácido Vanílico	0,182	0,016	<LOD	<LOD
Ácido Cafeico	<LOD	0,10	<LOD	<LOD
Epicatequina	0,80	1,33	0,37	<LOD
Ácido Siríngico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido p-cumárico	<LOD	0,07	<LOD	<LOD
Ácido Sinápico	0,49	0,45	0,07	0,28
Ácido Ferúlico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Miricitrina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Rutina	6,32	15,96	1,40	0,84
Ácido Elágico	0,58	2,75	<LOD	<LOD
Miricetina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Quercetina	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Ácido Cinâmico	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Kaempferol	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
Total (soma dos compostos fenólicos)	31,99	43,47	14,98	36,12

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

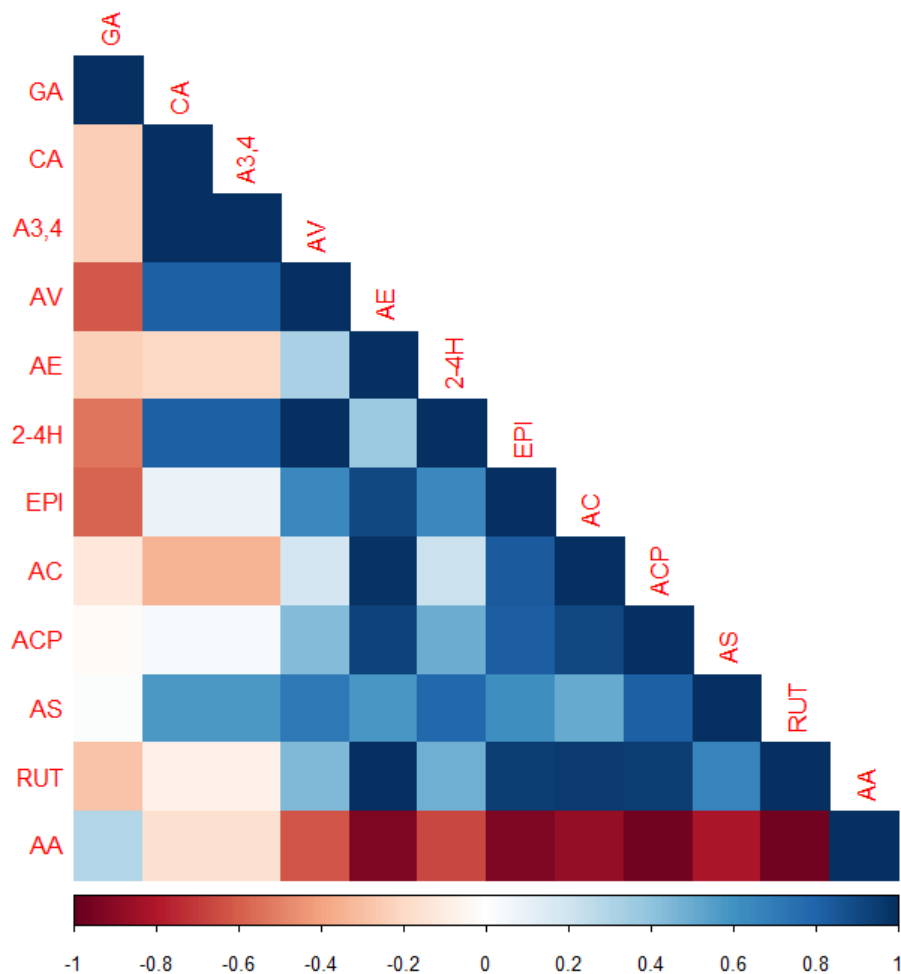
Figura 26. Cromatograma obtido por HPLC para os tratamentos: Comet Importado (A – azul); Comet Brasileiro (A- vermelho); Fuggle Importado (B- azul); Fuggle Brasileiro (B – vermelho) no comprimento de onda 255 nm.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Existe uma correlação negativa entre o conteúdo de alfa-ácidos dos cultivares com os compostos fenólicos individuais (Figura 22). Com exceção da galocatequina, as cervejas em que os lúpulos com menores percentuais de alfa-ácidos foram utilizados apresentaram maiores valores de compostos fenólicos individuais. O resultado está de acordo com o encontrado com a análise de compostos fenólicos totais, em que as cervejas produzidas com os cultivares que apresentaram menores valores de alfa ácidos deram origem a bebidas com maior teor de compostos fenólicos totais.

Figura 27. Correlação para os compostos fenólicos: galocatequina (GA); catequina (CA); ácido 3,4-dihidroxibenzoico (A3,4); ácido vanílico (AV); ácido elágico (AE); 2-(4-hidroxifenil)etanol (2-4H); epicatequina (EPI); ácido cafeico (AC); ácido p-cumárico (ACP); ácido sinápico (AS); rutina (RUT) e alfa ácidos (AA) em cervejas produzidas com dois cultivares de lúpulo provenientes de duas regiões.



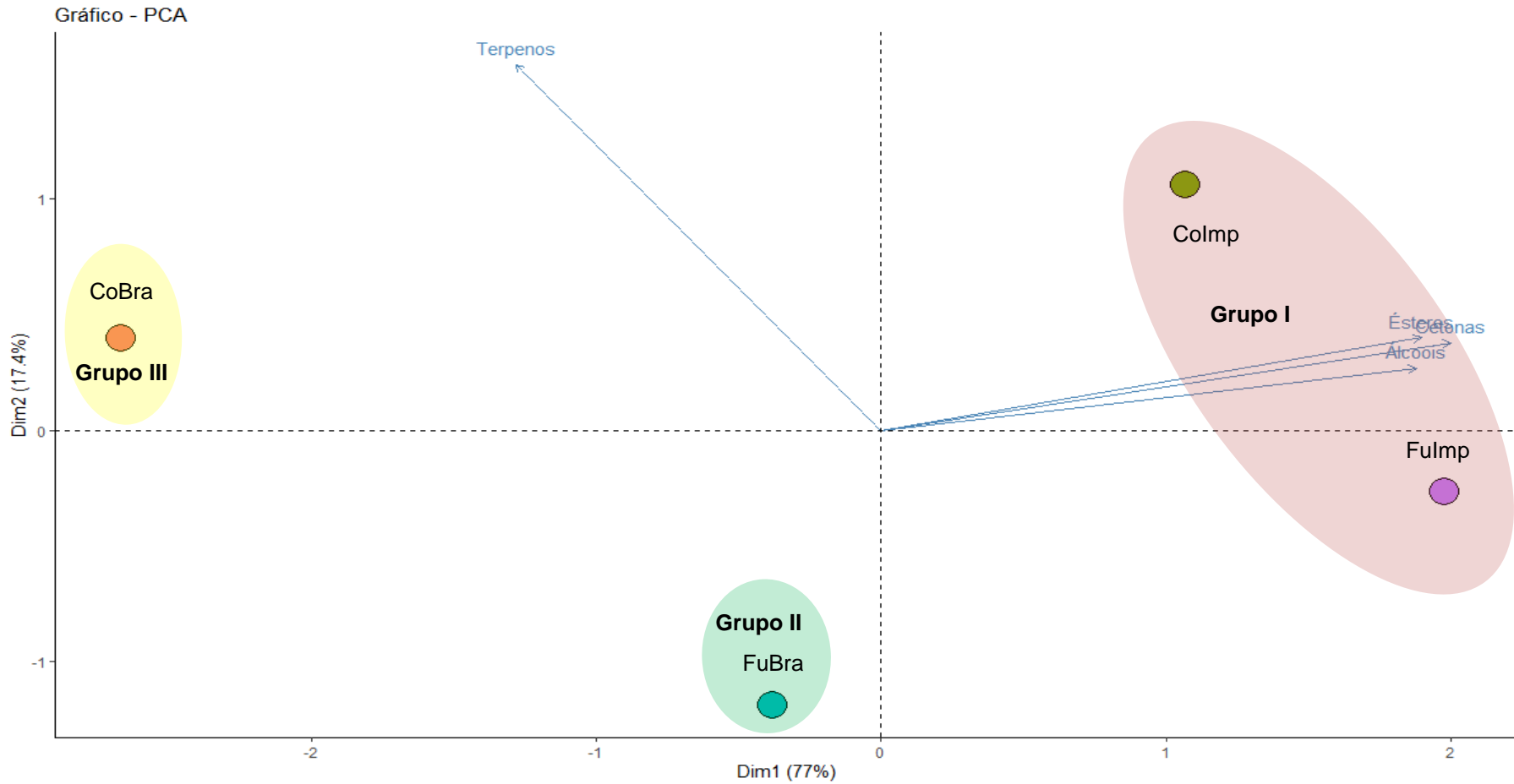
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

6.4.2 Perfil de compostos voláteis

Para a análise de componentes principais, foram escolhidas duas componentes, com base em uma variância acumulada de 94,4%. O Gráfico foi construído com os compostos mais relevantes para determinar as diferenças entre os cultivares (Comet e Fuggle) e origens (brasileiro e importado) do lúpulo.

A Figura 23 mostra as variâncias das duas primeiras componentes, que explicam 94,4% do total de informações do modelo, sendo 77 % explicada pela primeira componente e 17,4% explicada pela segunda componente.

Figura 28. Análise de componentes principais (PCA) para os grupos de compostos voláteis: álcoois, cetonas, ésteres e terpenos utilizando lúpulo “Comet” ou “Fuggle” importado ou brasileiro na produção de cervejas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

A componente principal 1 mostra a separação das amostras em relação as origens dos lúpulos utilizados para a produção das cervejas, sendo que, as cervejas que foram produzidas com o lúpulo importado, ficaram localizadas no quadrante direito, enquanto que, as que cervejas que foram produzidas com o lúpulo brasileiro localizaram-se no quadrante esquerdo. Isto indica que os compostos fenólicos com maiores cargas na dimensão 1 podem ser importantes na distinção entre as cervejas produzidas provenientes de diferentes locais.

De acordo com a dimensão 1, há uma associação positiva das cervejas produzidas com o lúpulo importado com os seguintes grupos de compostos voláteis: álcoois, ésteres e cetonas. O Grupo I, composto pelos tratamentos Fulmp e Colmp, apresentaram maiores concentrações desses compostos em virtude de sua localização, mais à direita do gráfico, em relação ao Grupo II (FuBra) e Grupo III (CoBra).

A componente principal 2 mostra a separação das amostras em relação o cultivar de lúpulo na produção das cervejas, sendo que, as bebidas produzidas com o lúpulo Comet ficaram localizadas no quadrante superior do gráfico e aquelas produzidas com o lúpulo Fuggle localizaram-se no quadrante inferior. Os resultados demonstram que os compostos fenólicos com maiores cargas na dimensão 2 podem ser importantes na distinção entre as cervejas produzidas com o lúpulo Comet e o lúpulo Fuggle. Dentro do grupo dos terpenos, os monoterpenos, como (E)-b-ocimeno, (Z)-b-ocimeno, citronelol, geraniol, geranato de metila, acetato de geranila e os sesquiterpenos, como o γ -cadineno representam compostos relevantes nas cervejas finais, embora suas quantidades no lúpulo sejam baixas (PEACOCK; DEINZER, 1981; TAKOI et al., 2010).

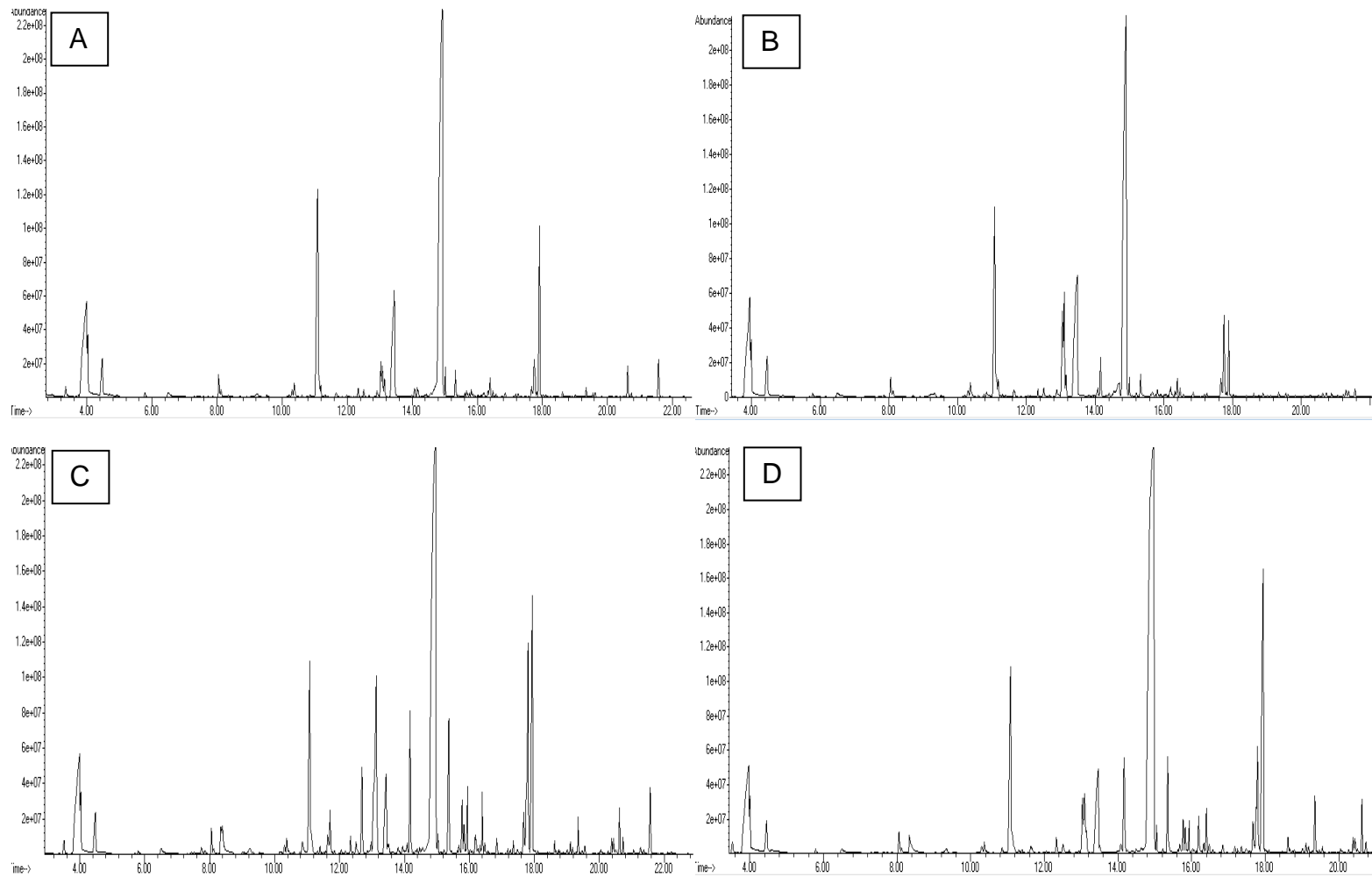
De acordo com a dimensão 2, há uma associação positiva das cervejas produzidas com lúpulo Comet com os terpenos, indicando maiores teores desses compostos em comparação com a utilização do lúpulo Fuggle. Os compostos (E)-b-ocimeno, (Z)-b-ocimeno, citronelol, geraniol, geranato de metila, acetato de geranila e γ -cadineno apresentaram concentrações 288; 179; 419; 767; 70; 274 e 271% superiores, respectivamente, nas cervejas produzidas com o lúpulo Comet em comparação aquelas que foram elaboradas com o lúpulo Fuggle. Esses compostos estão presentes em diferentes concentrações entre os cultivares de lúpulo e não está claro se esse resultado é referente à formação por oxidação devido ao

armazenamento do lúpulo ou por transformação química durante a ebulição do mosto (GOIRIS et al., 2002).

As cervejas produzidas com o lúpulo Fuggle Brasileiro (Grupo II), apresentaram as menores concentrações de terpenos. O Grupo II, por estar localizado em uma posição intermediária entre os Grupos I e III, pode ser considerado intermediário, indicando concentrações medianas de álcoois, cetonas e ésteres nas cervejas que se utilizou Fuggle Brasileiro.

A Figura 24 demonstra os cromatogramas dos compostos voláteis obtidos para as cervejas produzidas com o cultivar Fuggle produzido no Brasil (A); Fuggle importado (B); Comet produzido no Brasil (C) e Comet Importado (D).

Figura 29. Cromatogramas CG-MS das cervejas produzidas com o lúpulo Fuggle Brasileiro (A); Fuggle Importado (B); Comet Brasileiro (C) e Comet Importado (D).



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

6.5 CONCLUSÕES

Em conclusão, os dados apresentados indicam que quanto menor o teor de alfa ácidos do lúpulo (Fuggle Brasileiro) maior será a concentração fenólica e antioxidante da cerveja.

Cada estilo de cerveja pode variar na quantidade de compostos bioativos com base na seleção do lúpulo.

As cervejas produzidas com o cultivar Fuggle Brasileiro contém maior teor de substâncias antioxidantes.

Os resultados confirmam que os cultivares e a origem do lúpulo influenciam no perfil aromático das cervejas produzidas.

7 CARACTERIZAÇÃO DE CERVEJA ARTESANAL PRODUZIDA COM LÚPULO BRASILEIRO E SEU DESEMPENHO NO TEMPO DE PRATELEIRA

7.1 RESUMO

A produção de lúpulo brasileiro possui importância para as cervejarias devido ao menor período de estocagem em relação ao lúpulo importado, o que pode conservar mais as propriedades desejáveis dando origem a um produto mais nobre. Uma vez que a maioria das cervejas produzidas artesanalmente não são pasteurizadas, acabam deteriorando-se mais rapidamente, portanto, torna-se importante verificar o tempo de prateleira das mesmas. Diante disso, objetivou-se através da realização deste estudo, avaliar três cultivares de lúpulo desidratado (Cascade, Columbus e Chinook), provenientes do cultivo no campo experimental do CAV/UEDESC em Lages-SC, na produção de cerveja estilo “IPA” durante cinco períodos de armazenamento do produto (0, 45, 90, 135 e 180 dias após o envase). A análise dos componentes principais elucidou que a cerveja produzida com o cultivar Chinook está correlacionada positivamente com maioria das características avaliadas: compostos fenólicos totais, proteínas, flavonoides, pH e turbidez. Observou-se decréscimo significativo no teor de compostos fenólicos totais e flavonoides ao longo dos períodos de armazenamento para todas as cultivares analisadas, entretanto, as cervejas produzidas com os cultivares Cascade e Columbus apresentaram maior estabilidade dessas características em comparação com a utilização do lúpulo Chinook. Concluiu-se que as cervejas produzidas com o lúpulo Chinook possuem maiores valores de características desejáveis, porém, devem ser consumidas mais rapidamente do que aquelas produzidas com os cultivares Columbus e Cascade.

7.2 INTRODUÇÃO

Ingrediente chave na produção de cervejas, o lúpulo é mundialmente conhecido e empregado na produção da bebida, conferindo amargor e aroma além de contribuir com a vida útil do produto devido as suas propriedades antissépticas (ALMEIDA, 2019). As glândulas de lupulina produzidas pelas inflorescências femininas (chamadas de estróbilos ou cones) são capazes de sintetizar e armazenar resinas e óleos essenciais (FARAG; WESSJOHANN, 2013).

Os maiores produtores de lúpulo do mundo estão localizados no hemisfério norte, sendo que os Estados Unidos e a Alemanha representam quase 80% da produção mundial desta cultura (IHGC, 2020). No Brasil o cultivo do lúpulo foi intensificado na última década impulsionado pelo aumento no número de cervejarias, ainda assim, o país importa quase a totalidade desse insumo para a produção de cervejas, tornando o produto mais caro e com a qualidade reduzida (FAGUERAZZI, 2020). A produção de lúpulo nacional, portanto, tem papel fundamental para a indústria cervejeira, influenciando diretamente na qualidade de aroma e de sabor do produto final, já que seu período de estocagem é menor, preservando os compostos desejáveis para a produção de cervejas, além da redução de custos para aquisição do insumo (PINTO, 2018).

A avaliação do tempo de vida útil (ou tempo de prateleira) de um produto pode ser realizada a partir da observação e análise de parâmetros de acordo com o tempo decorrido (NIMUBONA et al., 2013). Assim como nos outros alimentos, diversos parâmetros da cerveja podem ser sofrer alterações durante o armazenamento. Visto que na produção de cerveja artesanal não são utilizados aditivos, o lúpulo vai ter um papel fundamental na conservação da mesma, já que possui propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sendo por isso, considerado um conservante natural da bebida (EBLINGER H., 2009).

Diante disso, objetivou-se através da realização deste trabalho, avaliar características físico-químicas de cervejas artesanais estilo IPA produzidas com três cultivares de lúpulo provenientes do Planalto Serrano de SC durante cinco períodos de armazenamento da bebida.

7.3 MATERIAL E MÉTODOS

7.3.1 Processamento da cerveja artesanal

As cervejas foram produzidas no Núcleo de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV) em Lages/SC no ano de 2020.

A bebida foi preparada de forma artesanal, com o auxílio de painéis automáticas em aço inox 304 com capacidade total de 30 litros cada uma, em sistema Single Vessel, que possibilita a brassagem e a fervura do mosto em um único equipamento.

7.3.2 Matérias-primas

Malte

Para a produção de 20 litros de cerveja, foram utilizados 5 quilos de malte Pale Ale e 330 gramas de malte Crystal. Os maltes, já triturados, foram adquiridos na loja de insumos cervejeiros Serena Brew Shop.

Água

A água que foi utilizada no processo de produção das cervejas é proveniente de poço artesiano que abastece a UDESC/CAV e passou por uma prévia filtração a qual eliminou qualquer tipo de impureza que pudesse estar presente.

Lúpulo

Foram utilizadas três cultivares de lúpulo: Cascade, Chinook e Columbus provenientes do cultivo desta planta no campo experimental da UDESC/CAV, safra de 2018, onde as flores após colhidas foram desidratadas (até atingir umidade em torno de 12-13%), seladas à vácuo e armazenadas em freezer até a sua utilização.

Levedura

A levedura utilizada na etapa de fermentação da cerveja artesanal também foi adquirida na loja de insumos cervejeiros Serena Brew Shop e é do tipo *Saccharomyces cerevisiae* da marca Fermentis US-05. De acordo com as informações descritas pelo fabricante, essa levedura possui caráter neutro e com baixa produção de diacetil.

7.3.3 Mosturação

A mosturação é a etapa responsável por colocar as enzimas presentes no malte em atividade. Por meio do cozimento do malte com água quente, as enzimas convertem o amido em açúcares fermentáveis, dando origem ao mosto (Figura 25).

Figura 30. Etapa de cozimento dos grãos (mosturação)



Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

Cada tratamento totalizou 20 litros e para isso, foram utilizados 5 kg de malte Pale Ale e 330 gramas de malte Crystal previamente moídos, misturados com 16 litros água à 67°C, faixa considerada ideal para a atuação tanto da enzima alfa-amilase como da beta-amilase. A produção foi conduzida utilizando três panelas automáticas em sistema Single Vessel, com capacidade para 30 litros cada (Figura 26).

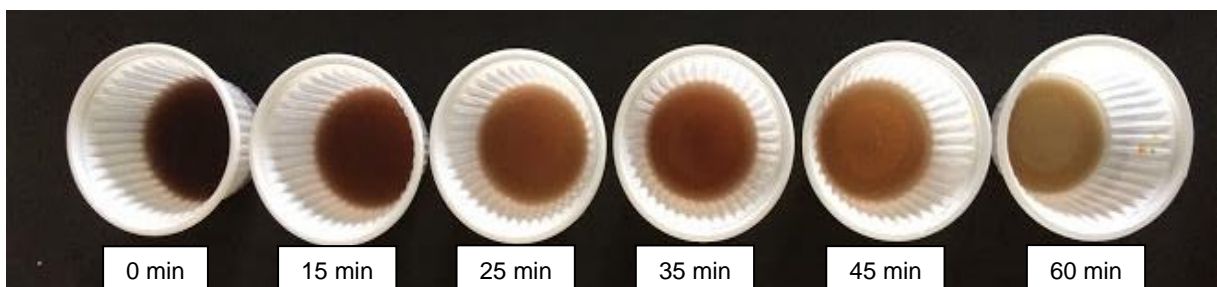
Figura 31 – Panela automática para produção de cervejas em sistema single vessel.



Fonte: Biermaschine, 2022.

Durante a mosturação foi realizado o teste com iodo a fim de verificar a presença de amido no mosto cervejeiro, visto que, o iodo reage com o amido formando um complexo de coloração roxo-azulada. Quando completados 60 minutos de cozimento, após a confirmação da completa hidrólise do amido pela ausência da coloração roxo-azulada, o mosto foi aquecido a 76°C durante 10 minutos com o objetivo de desnaturar as enzimas presentes. A Figura 27 mostra a diferença de coloração da reação do iodo na presença ou na ausência do amido durante a etapa de mosturação.

Figura 32 - Processo de conversão de amido em açúcares durante a mosturação através da realização do teste de iodo-amido.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

7.3.4 Separação dos grãos

Com o levantamento do cesto, o mosto foi transferido para a parte debaixo da panela onde ocorreu a fervura, sendo que, a filtragem tem como objetivo separar os

grãos de malte do mosto líquido. Nesta etapa é realizado o processo de lavagem dos grãos que tem como objetivo fazer com que todos os açúcares do mosto sejam levados para o processo de fervura. Para isto, utilizou-se 14 litros de água a 75,6°C. Finalizada esta etapa, os grãos foram descartados.

7.3.5 Fervura

Três cervejas do tipo *Indian Pale Ale* (IPA), com a mesma receita base, foram produzidas com a utilização de três cultivares de lúpulo brasileiro em flor desidratado (Figura 28).

Figura 33 – Lúpulo em flor desidratado proveniente do Planalto Serrano de SC utilizado para a produção das cervejas.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Na Tabela 9, os tratamentos utilizados para a produção das cervejas podem ser melhor visualizados.

Tabela 9 - Descrição dos tratamentos empregados para a realização do experimento.

<i>Indian Pale Ale</i>	<i>Early kettle</i> 60 min	<i>Midle boil</i> 30 min	<i>Late hopping</i> 0 min
Cascade	Flor (190g)	Flor (115 g)	Flor (115 g)
Chinook	Flor (190g)	Flor (115 g)	Flor (115 g)
Columbus	Flor (190g)	Flor (115 g)	Flor (115 g)

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

7.3.6 Resfriamento

Depois de finalizada a fervura, o mosto precisa ser resfriado o mais rapidamente possível para que não haja problemas relacionados à contaminação devido à diminuição da temperatura e para que atinja uma temperatura adequada para a inoculação das leveduras. Esta etapa contou com o auxílio de um *chiller* de imersão trocador de calor.

7.3.7 Fermentação e Maturação

Antes da inoculação da levedura, cada tratamento foi dividido em três fermentadores, os quais possuíam um montante de 20 litros de mosto cada. A levedura US-05 hidratada foi inoculada em uma concentração de 11,5 gramas para cada 20 litros de mosto produzido a uma temperatura de 25°C.

A fermentação primária ocorreu em fermentadores cônicos de aço inox com capacidade para 32 litros com torneira e *airlock* (Figura 29) a uma temperatura de 19°C. O monitoramento da densidade foi realizado diariamente até verificar-se, entre duas amostragens seguidas, valores de densidades constantes os quais indicam a finalização desta etapa, o que ocorreu em um intervalo de 6 dias.

Figura 34 – Fermentador cônico em aço inox utilizado para a etapa de fermentação das cervejas.



Fonte: Biermaschine.

Uma vez consumido todo o extrato fermentescível, iniciou-se o processo de maturação da cerveja, onde os fermentadores foram colocados em câmara fria com

temperatura de 0°C durante 15 dias com o objetivo clarificar a cerveja através da decantação das leveduras residuais e possíveis partículas presentes no mosto.

7.3.8 Limpeza das garrafas

Garrafas de cerveja na coloração âmbar com capacidade para 375 mL foram limpas com água e detergente com auxílio de uma escova. Depois, foram embebidas em uma solução de ácido peracético a 1% por 10 minutos, sendo enxaguadas posteriormente com água a uma temperatura de 80°C, finalizando o processo de sanitização.

7.3.9 Carbonatação

Com o objetivo de tornar a cerveja gaseificada, foi realizada uma adição extra de açúcares (6g L^{-1}) para que ocorresse uma re-fermentação em cada garrafa. O açúcar foi calculado individualmente para cada fermentador que possuía 20 litros de cerveja, para tanto, foi dissolvido em 10 partes de água fervendo e deixado resfriar antes de realizar a adição. Posteriormente, as garrafas previamente sanitizadas foram cheias através da torneira do fermentador e fechadas com tampinhas de rolha metálica *pry-off*. As garrafas de cerveja foram colocadas em temperatura ambiente durante 14 dias para serem carbonatadas. Logo após, deu-se início a avaliação do produto durante os cinco períodos de armazenamento (0; 45; 90; 135 e 190 dias após o envase).

7.3.10 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas no Núcleo de Tecnologia de Alimentos da Universidade do Estado de Santa Catarina. As seguintes variáveis foram mensuradas:

a) Acidez Total (meq L^{-1})

Foi determinada pelo método de titulação volumétrica com solução de NaOH 0,1 N (padronizada com biftalato de potássio), utilizando-se como indicador solução alcoólica de fenolftaleína a 1%. Foram pipetados 5 mL de amostra e 5 mL de água destilada em um béquer e titulado a solução de hidróxido de sódio até o ponto de viragem (EBC, 2005).

A acidez total foi expressa em meq L^{-1} , de acordo com a fórmula: Acidez Total (meq L^{-1}) = $(1000 \times n \times N_{\text{NaOH}})/v$, onde: n = volume da solução de NaOH gasto na titulação (mL); N = Normalidade da solução de NaOH; v = Volume da amostra (mL).

b) pH

O pH foi determinado pelo método eletrométrico utilizando um pHmetro de bancada (calibrado com as soluções padrão antes do uso), sendo medido em amostras de 10 ml de cerveja (EBC, 2005).

c) Turbidez

A análise para determinação da turbidez foi realizada em um turbidímetro portátil cuja calibração prévia foi realizada em quatro pontos: 0; 20; 100 e 800 NTU. Em seguida, efetuou-se a leitura da turbidez das amostras com valores expressos em NTU (EBC, 2005).

d) Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com a metodologia proposta por Singleton & Rossi (1965) com modificações realizadas por Zhao et al. (2010).

Para a quantificação dos compostos fenólicos totais, a 0,5 mL da amostra diluída (1:20), adicionou-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de Na_2CO_3 a 7,5%. O tubo de ensaio foi incubado por 5 min em Banho-Maria a 50°C. Após 15 min de repouso o complexo azul formado foi quantificado em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 760 nm. A medição é então comparada com uma curva padrão de ácido gálico e o resultado expresso em mg de ácido gálico equivalente (GAE) por litro de cerveja (mg GAE L^{-1}).

e) Flavonoides

Os flavonoides foram determinados por espectrofotometria, com leitura realizada na faixa de absorvância de 415 nm. Em tubos de ensaio, colocou-se 2 mL da amostra diluída (1:1) e acrescentou-se 2 mL de cloreto de alumínio à 2% em metanol. Após 30 minutos de repouso, as leituras foram realizadas. Os cálculos de concentração foram feitos a partir da curva de calibração usando o padrão

quercetina e os resultados foram expressos em mg de quercetina por litro de cerveja (mg QE L^{-1}) (MEDA et al., 2005).

f) Proteínas

Para a determinação de proteínas, utilizou-se o método do biureto, onde a 0,5 mL de amostra de cerveja, adiciono-se 3,5 mL do reativo de biureto. Após 30 minutos de repouso, as leituras foram realizadas na faixa de absorbância de 540 nm. As leituras das amostras foram comparadas com uma curva padrão de caseína e o resultado foi expresso em g de caseína por 100 mL de cerveja (GORNALL *et al.*, 1949)

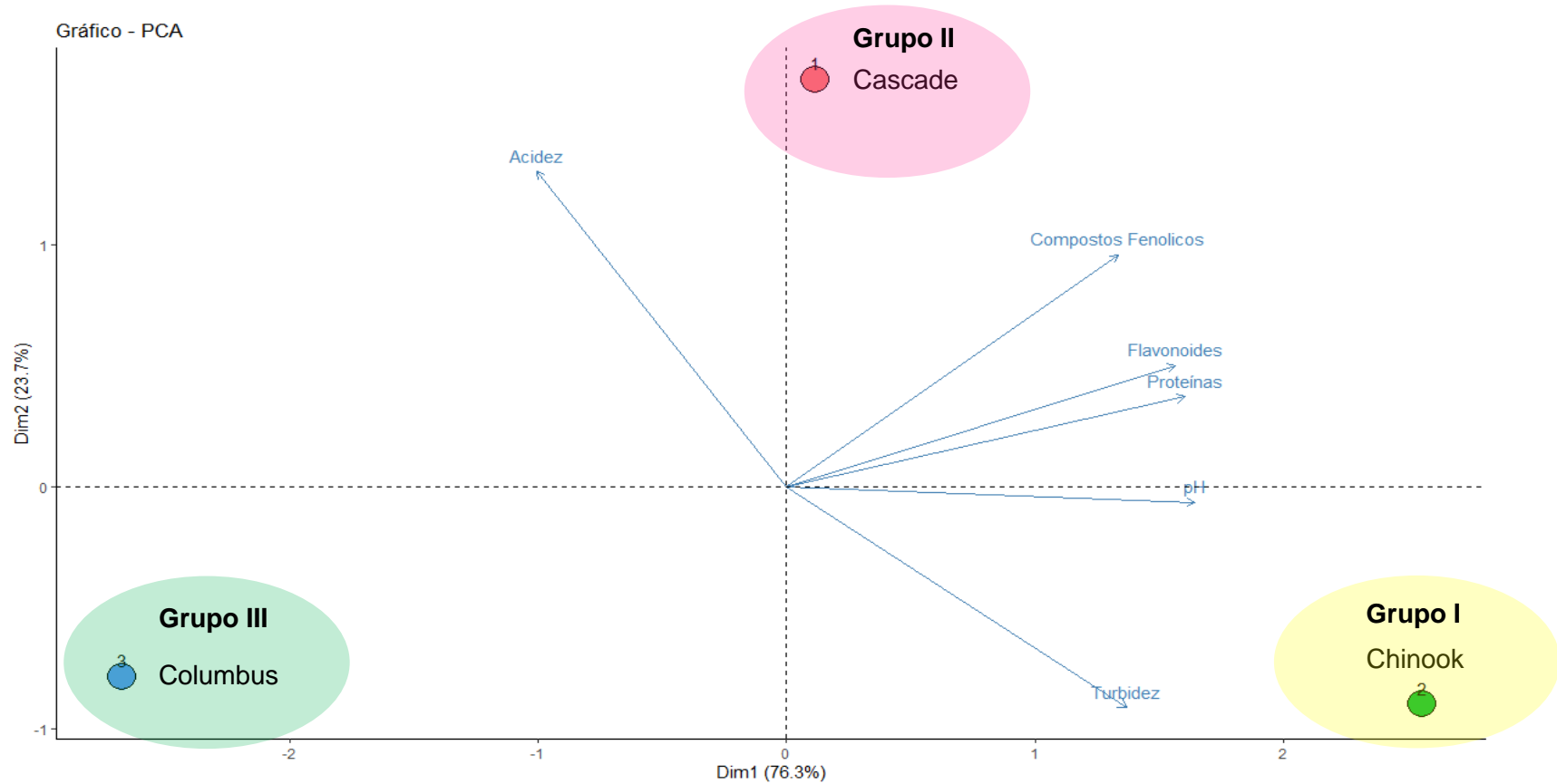
7.3.11 Análise Estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos pelo teste F, as médias dos períodos de avaliação foram submetidas à análise de regressão à 5% de probabilidade de erro com o auxílio do programa estatístico R (R CORE TEAM, 2013). Além disso, as médias dos cinco períodos de avaliação para cada cultivar foram analisados pela análise dos componentes principais também com o auxílio do programa estatístico R.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise de componentes principais, avaliada na média de todos os períodos de avaliação, os dois primeiros componentes representaram 100% da variação obtida (76,8% para a componente principal 1 e 23,2% para a componente principal 2) permitindo a análise conjunta das variáveis e dos tratamentos em um gráfico bidimensional. De acordo com as variáveis estudadas, identificou-se a diferenciação dos cultivares de lúpulo na produção de cervejas em principalmente três grupos (Figura 30).

Figura 35- Análise dos componentes principais (ACP) para as variáveis: turbidez; compostos fenólicos totais; flavonoides; proteínas; acidez total e pH para as cervejas produzidas com os cultivares Cascade, Columbus e Chinook.



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

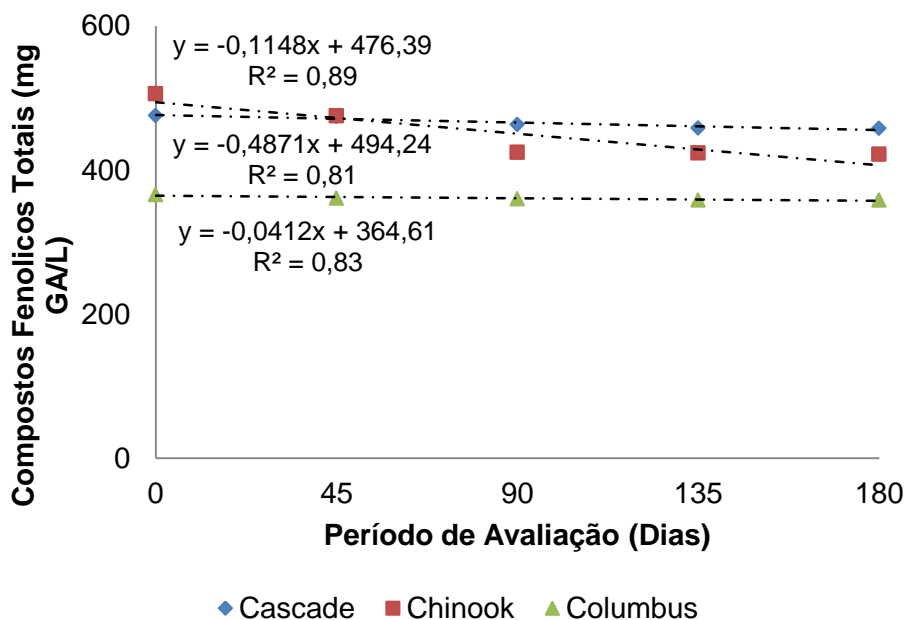
O Grupo I, representado pelo cultivares Chinook, diferenciou-se do Grupo II, representado pelo cultivar Cascade, e do Grupo III, representado pelo cultivar Columbus, principalmente pelas variáveis compostos fenólicos totais, flavonoides, proteínas, turbidez e pH. A correlação positiva do Grupo I com estas variáveis indica que as cervejas produzidas com esse cultivar possui maiores valores em relação à utilização do cultivar Cascade ou Columbus para a produção das cervejas.

As cervejas produzidas com o cultivar Cascade, apresentaram comportamento das variáveis compostos fenólicos totais, flavonoides e proteínas em uma condição intermediária entre Chinook e Columbus.

O fato da análise dos componentes principais ter correlacionado positivamente as cervejas produzidas com o cultivar Chinook com os compostos fenólicos totais e flavonoides, representa um grande interesse para os cervejeiros, visto que alguns estudos consideram essas variáveis como indicadores de qualidade para o processamento e conservação da bebida (MITIĆ et al., 2013). Além disso, o teor de compostos fenólicos gera atenção devido às suas características antioxidantes e desempenha papéis nas propriedades sensoriais e de estabilidade coloidal das cervejas durante o armazenamento (PAUNOVIC et al., 2015; ARON et al., 2010; VANDERHAEGEN et al., 2006). As proteínas, também correlacionadas positivamente com as cervejas produzidas com o cultivar Chinook, contém valor nutricional e são muito importantes no fornecimento de aminoácidos que auxiliam no crescimento da levedura além de substâncias nitrogenadas que desenvolvem um papel importante na formação da espuma (OLIVEIRA, 2016). Em contrapartida, o teor de proteínas, pode ser indesejável, visto que o excesso pode se ligar aos compostos fenolicos da cerveja e formar complexos insolúveis, causando turbidez e comprometendo a estabilidade da bebida (ROVALETTI et al., 2014).

O teor de compostos fenólicos totais e a atividade redutora do lúpulo diminuem durante o armazenamento da cerveja (KROFTA et al., 2008; MIKYŠKA & KROFTA, 2012). Os resultados obtidos confirmam esta afirmação, onde verificou-se através da análise de regressão, decréscimo significativo no teor de compostos fenólicos totais ao longo dos períodos de armazenamento para todas os cultivares analisadas (Figura 31).

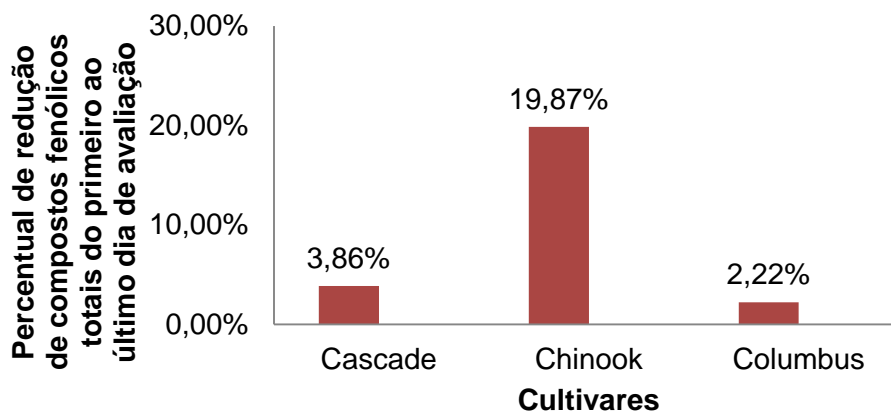
Figura 36. Compostos Fenólicos Totais (mg GAE/L) para três cultivares de lúpulo brasileiros na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

O decréscimo nos valores dessa variável, do primeiro ao último dia de avaliação, foi mais acentuado quando utilizado os cultivares Chinook, Cascade e Columbus, respectivamente. O cultivar Chinook apresentou uma redução de cerca de 84 mg de ácido gálico/L do início ao final das avaliações, o que representa quase 20%. Logo em seguida, verifica-se na cultivar Cascade uma queda de 17,70 mg de ácido gálico/L, o que corresponde a pouco 3,86%. E por fim, a cultivar Columbus, apresentou a menor taxa de queda, 8 mg de ácido gálico/L representando pouco mais de 2% (Figura 32).

Figura 37. Percentual de redução de compostos fenólicos do primeiro ao último dia de avaliação para três cultivares de lúpulo brasileiro na produção de cervejas estilo IPA.

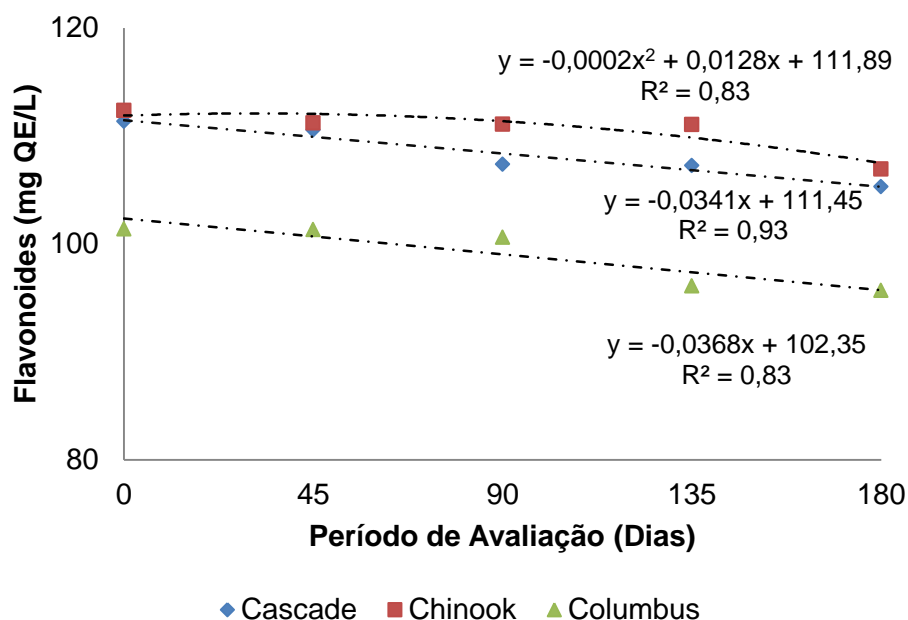


Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Em um experimento realizado por Mikyška & Krofta (2012) o teor de compostos fenólicos totais perdidos após doze meses de prateleira variou de 30-40%. A menor redução dos compostos fenólicos possui efeito positivo em relação ao armazenamento, visto que, essa variável é responsável pela preservação das qualidades sensoriais da bebida através da ação antioxidante (JANDERA, 2009). Os compostos fenólicos agem retardando a degradação da cerveja ao longo do tempo e a produção de componentes químicos que causam atributos sensoriais indesejáveis (OBERHOLSTER; BRADLEY, 2016).

Da mesma forma em que os compostos fenólicos totais, o conteúdo de flavonoides presentes nas cervejas produzidas com quaisquer dos cultivares estudados, apresentaram decréscimo na medida em que se avançou o tempo de armazenamento (Figura 33).

Figura 38- Flavonoides (mg QE/L) para três cultivares de lúpulo produzidas no Brasil utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.



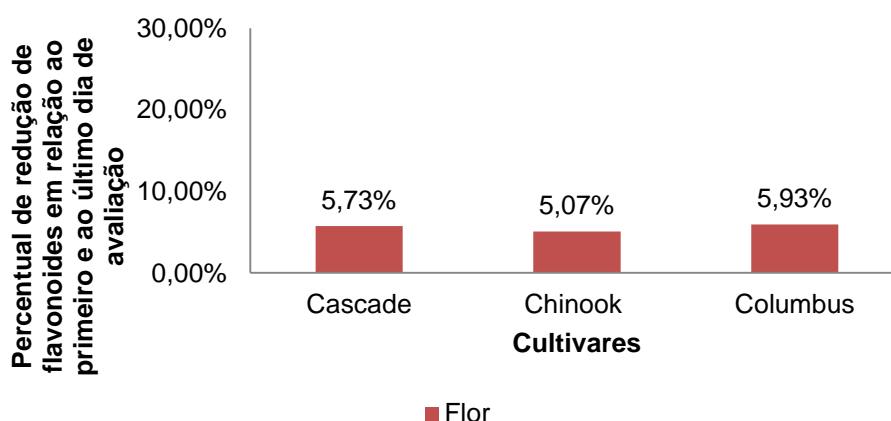
Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Em termos de compostos fenólicos na cerveja e sua potencial atividade biológica, os flavonoides estão entre os mais estudados (BORONAT et al., 2020). Esses compostos fenólicos são associados a atividades biológicas relevantes, como potencial antioxidante, propriedades anti-inflamatórias, antidiabéticas e atividades estrogênicas (OSORIO-PAZ et al., 2019). De acordo com Boronat et al. (2020), as cervejas do estilo IPA, como a do estudo em questão, apresentam maiores concentrações de flavonoides, visto que, esse estilo de cerveja é caracterizado pela utilização de uma grande quantidade de lúpulo, o qual é conhecido por sua atividade antimicrobiana e por melhorar a estabilidade da bebida, portanto, uma maior quantidade de flavonoides é esperada.

O percentual de decréscimo no conteúdo de flavonoides, do primeiro ao último dia de avaliação, foi mais acentuado quando utilizado os cultivares Columbus, Cascade e Chinook, respectivamente. (Figura 34). O cultivar Columbus apresentou uma redução de cerca de 6% do início ao final das avaliações. Logo em seguida,

verifica-se no cultivar Cascade uma queda de 5,73%, e por fim, o cultivar Chinook, apresentou um decréscimo de aproximadamente 5% no conteúdo de flavonoides.

Figura 39. Percentual de redução de flavonoides em relação ao primeiro e ao último dia de avaliação para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA.

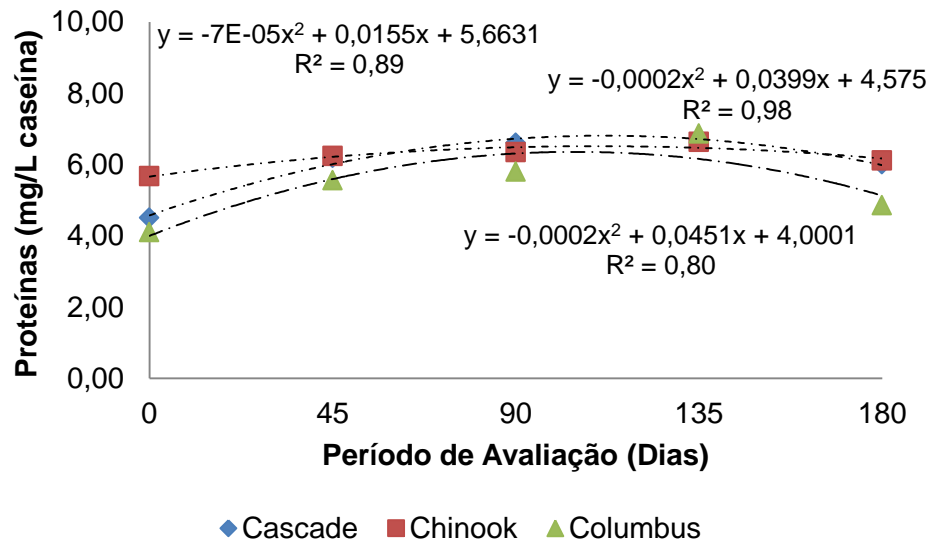


Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

O fato do cultivar Chinook apresentar menor redução no conteúdo de flavonoides ao longo do período de armazenamento faz com que os processos de oxidação na cerveja, os quais levam à deterioração no sabor durante o armazenamento, sejam desacelerados devido a maior capacidade antioxidante atribuída a maior presença dessa classe de compostos fenolicos (JASKULA-GOIRIS et al., 2014).

A análise de regressão polinomial para os períodos de avaliação foi significativa para todas as cultivares e observou-se aumento nos valores de proteínas até os 135 dias após o armazenamento com posterior redução nas médias dessa variável após esse período (Figura 35).

Figura 40. Proteínas (g caseína/L) para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.

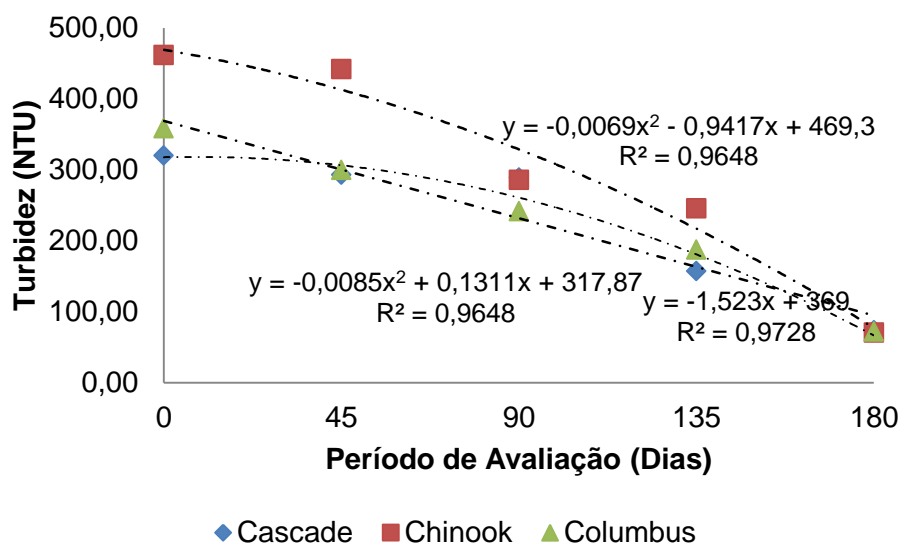


Fonte: Elaborado pela autoradora, 2021.

A composição química das flores do lúpulo é complexa e pode ser agrupada em metabólitos secundários produzidos pela planta em diferentes frações, sendo as proteínas, responsáveis por 15% da composição (ALMAGUER, 2014). As proteínas são uma das principais causas de turbidez na cerveja, que é um dos parâmetros de qualidade da bebida (NEUGRODDA et al., 2014). Segundo os mesmos autores, a quantidade de proteína depende do tipo de lúpulo utilizado. Os extratos, por exemplo, podem ter uma concentração menor de proteínas que pode ser benéfica em relação à turbidez enquanto que, pellets podem apresentar um conteúdo mais elevado de proteínas com influência negativa na turbidez, porém positiva em relação à estabilidade da espuma.

A turbidez das cervejas produzidas com diferentes cultivares de lúpulo em flor ao longo dos períodos de armazenamento pode ser verificada na Figura 36. Com exceção da cerveja produzida com o cultivar Chinook, a qual apresentou estabilidade nos dois primeiros períodos de avaliação, as demais cervejas apresentaram redução nos valores de turbidez desde o primeiro período de armazenamento.

Figura 41. Turbidez (NTU) para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor e em pellet na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

A turbidez é formada por diversos componentes, entretanto, a causa mais frequente é a combinação de compostos fenólicos com proteínas (STEINER et al., 2010). Siebert et al. (1996) propôs que cada proteína possui um sítio de ligação em que o polifenol pode se anexar, sendo que, cada molécula de polifenol deverá encontrar dois sítios de ligação de proteínas para se ligar. De acordo com os mesmos autores, a ocupação de todos os sítios de ligação das proteínas pelos compostos fenólicos resulta em grandes partículas coloidais e máxima dispersão da luz causada pela turbidez do meio.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que houve aumento no conteúdo de proteínas até determinado ponto e conseqüentemente aumento no número de sítios de ligação disponíveis para os compostos fenólicos, mas mesmo assim, verificou-se redução na turbidez desde o primeiro dia de armazenamento para as cervejas produzidas com o cultivar Columbus. O tratamento mencionado anteriormente apresentou uma concentração de compostos fenólicos inferior à 400 mg GAE/L durante todo o armazenamento e sugere-se que essa quantidade não foi

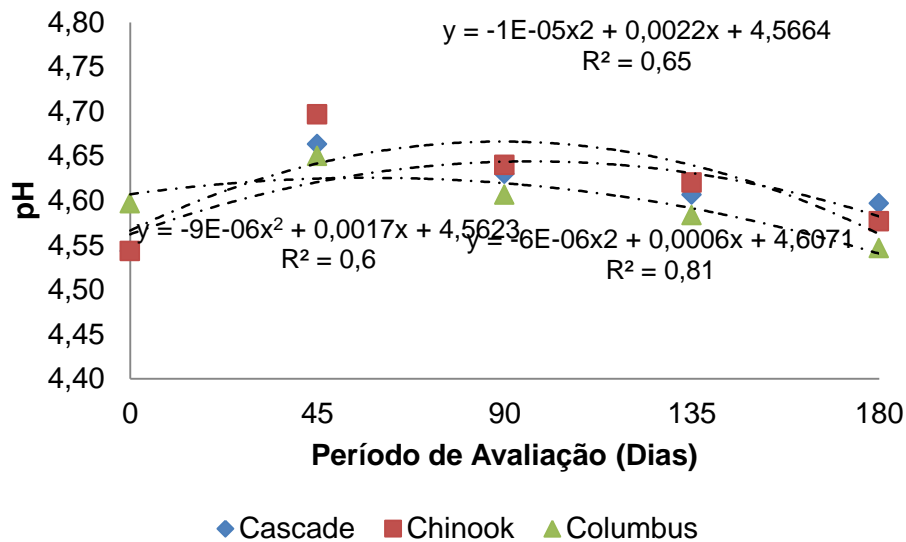
suficiente para ocupar todos os sítios de ligação das proteínas presentes na bebida e elevar ou apenas manter a turbidez. Há um indicativo que na medida em que se aumentou o tempo de armazenamento, houve redução nos polifenóis e consequente redução na turbidez, visto que, cada vez menos moléculas de compostos fenólicos conseguiram se ligar as proteínas e menos partículas coloidais foram formadas além de ocorrer a precipitação dos precursores da turbidez.

A turbidez da cerveja produzida com o cultivar Cascade apresentou valores constantes até os 90 dias após o armazenamento, e houve aumento na quantidade de proteínas até esse período, indicando que a quantidade de polifenóis presentes na bebida (próximo de 500 mg GAE/L) conseguiu ocupar os sítios de ligação das proteínas sendo responsável apenas por manter a turbidez, mas não elevá-la. Comportamento semelhante foi verificado com a utilização do cultivar Chinook, que apesar do aumento na quantidade de proteínas, observou-se uma manutenção na turbidez da bebida até os 45 dias de armazenamento, indicando que os compostos fenólicos totais presentes na cerveja não foram capazes de ocupar todos os sítios de ligação das proteínas de modo que se elevassem as taxas de turbidez e sim, foram responsáveis apenas por manter as médias dessa variável.

A estabilidade coloidal é importante na produção de cervejas tanto para a eliminação da turbidez durante o armazenamento (ANDERSON et al., 2019; JASKULA-GOIRIS et al., 2019) quanto para a manutenção de um determinado nível dessa variável que nas cervejas artesanais é considerado como uma característica desejável (MASTANJEVIK et al., 2018).

As médias do pH das cervejas produzidas com os diferentes cultivares ao longo dos períodos de armazenamento pode ser verificada na Figura 37. De acordo com a análise de regressão, houve um aumento nos valores de pH das cervejas produzidas com todos os cultivares estudados até os 45 dias após o envase com posterior redução nas médias nos demais períodos.

Figura 42- pH para três cultivares brasileiras de lúpulo utilizadas em flor na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

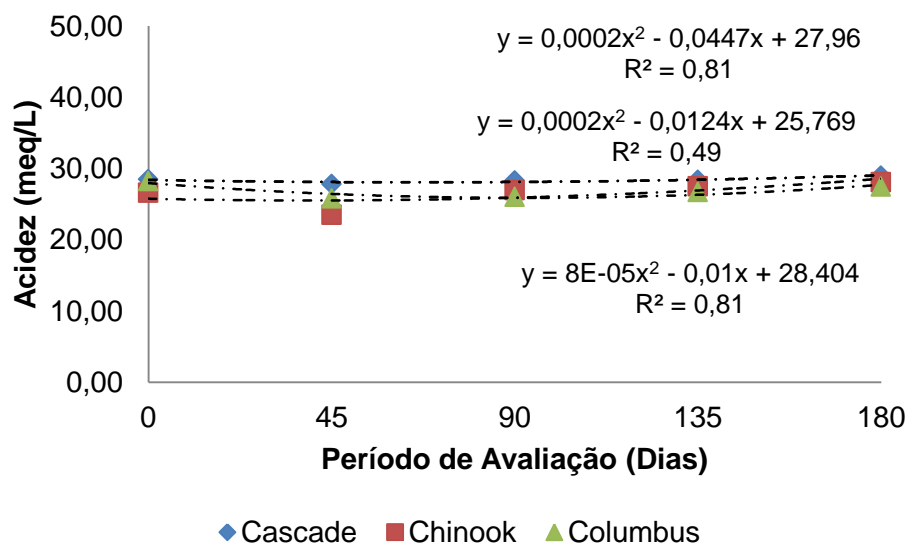
A cerveja é considerada um produto ácido e deve apresentar valores de pH compreendidos entre 4,3 a 4,6 para uma melhor estabilidade microbiológica ao longo do seu tempo de prateleira (CERQUEIRA, 2016). Nas médias de todos os períodos de avaliação, as cultivares estudadas em ambos os formatos apresentaram valores de acordo com os indicados na bibliografia.

Os maiores valores de pH aos 45 dias após o envase pode ser indicativo de ocorrência de autólise de leveduras (ESSLINGER, 2009; BAMFORTH, 2003). Já a diminuição nos valores de pH a partir dos 45 dias pode indicar a formação de subprodutos, como ácidos orgânicos, devido a ocorrência de refermentações nas garrafas que podem ter sido influenciadas pelas temperaturas de armazenamento (BARTH, 2013).

O pH é uma variável importante na percepção do amargor da bebida (MAYE et al., 2016). Valores mais altos de pH da cerveja podem ser benéficos na estabilidade dos iso- α -ácidos durante o armazenamento, visto que, esses compostos são menos propensos a degradação com pH mais alto da bebida (INTELMANN et al., 2011). Em contrapartida, valores mais altos de pH podem ser considerados uma desvantagem, visto que, influenciam a estabilidade biológica da cerveja.

As médias de acidez total ao longo dos períodos de avaliação podem ser visualizadas na Figura 38, através do gráfico de regressão. As médias de acidez para a cerveja produzida com os cultivares Cascade, Chinook e Columbus foram de 28,42, 26,54 e 26,86 meq/L, respectivamente.

Figura 43. Acidez total (meq/L) para três cultivares de lúpulo utilizadas em flor e em pellet na produção de cervejas estilo IPA ao longo de cinco períodos de armazenamento da bebida.



Fonte: Elaborado pela autora, 2021.

Na literatura não foram encontrados valores padrão para a acidez total visto que, os parâmetros para essa variável não são determinados pela legislação (BRASIL, 2009).

O principal responsável pela acidez da cerveja é o ácido carbônico, resultante da reação entre o CO_2 e a H_2O , que eleva a acidez da bebida (OLIVEIRA et al., 2015). A maioria dos ácidos presentes na cerveja já existe no mosto em proporções distintas e suas concentrações variam em função da matéria-prima utilizada (VENTURINI FILHO, 2000). Aumentos nos níveis de acidez ao longo dos períodos de armazenamento podem ser resultantes de refermentações em garrafas, as quais elevam o níveis de CO_2 .

Os maiores valores de acidez total foram verificados nas cervejas produzidas com o cultivar Cascade as quais possuem a maior concentração de compostos fenólicos totais, que são ácidos orgânicos. Portanto, uma maior produção de ácidos fenólicos contribuiu para uma maior acidez e conseqüentemente com maiores valores desta variável nesse tratamento. Assim como em outras bebidas, o conteúdo de ácidos orgânicos é importante para contribuir com o frescor e com o preenchimento de boca (GIRSCHIK, et al., 2017) e de acordo com este estudo, essas características devem ser encontradas com maior intensidade nas cervejas produzidas com o cultivar Cascade devido a presença de maior acidez.

7.5 CONCLUSÕES

A utilização do lúpulo brasileiro em flor, cultivar Chinook, possui grande potencial para a produção de cervejas, com melhores características desejáveis para a produção da bebida.

As cervejas produzidas com o lúpulo Cascade e Columbus possuem uma maior estabilidade ao longo do período de armazenamento do que se comparado ao uso do lúpulo Chinook, preservando melhor as características desejáveis.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo desses anos de estudo, nos tornamos um centro de referência em pesquisa com o uso do lúpulo brasileiro na elaboração de cervejas e fomos agraciados com importantes premiações no setor cervejeiro. A produção de uma cerveja com a utilização de lúpulo Chinook em flor desidratado, cultivado no campo experimental da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC/CAV), conquistou a sexta colocação no concurso “Em busca da melhor IPA caseira” realizado pela Serena BrewShop. Além disso, o projeto “Catharina Sour produzida com morango e lúpulo cultivados no Estado de Santa Catarina” submetido ao “Desafio Cervejeiro” proposto pela AMBEV (maior fabricante de cervejas no mundo) foi uma das cinco propostas selecionadas, dentre mais de 70 recebidas de estudantes de todo o Brasil.

Do ponto de vista científico e tecnológico, com os resultados obtidos através desta tese, será possível subsidiar com informações produtores, setor industrial, pesquisadores e estudantes que atuam na cultura do lúpulo e no setor produtivo de cervejas, validando novos modelos com técnicas inovadoras a fim de garantir a produção de cervejas de modo eficiente e rentável elevando a competitividade da utilização do lúpulo produzido no Brasil.

Este estudo também contribui para que cervejarias, nacionais e internacionais, consigam produzir o perfil desejado de uma cerveja, visto que, o lúpulo cultivado no Brasil conferiu aromas diferenciados se comparado com a utilização do lúpulo importado. Além disso, há uma contribuição para a pesquisa cervejeira em termos de inovação, evolução e crescimento da utilização do lúpulo nacional na elaboração de cervejas.

9 REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2007, 800 p.
- ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: a review of its potentials and applications. **African Journal Biotechnoly**, v. 10, p. 324–331, 2011.
- ALMAGUER, C.; SCHONBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E.K; BECKER, T. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v.20, n.4, p.289-314, 2014.
- ALMEIDA, A.R. **Caracterização do lúpulo (*Humulus lupulus* L.) cultivado no Brasil, obtenção dos seus extratos e aplicação em filmes poliméricos**. 2019. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.
- ALONSO-ESTEBAN, J. I.; PINELA, J.; BARROS, L.; ĆIRIĆ, A.; SOKOVIĆ, M.; CALHELHA, R. C.; TORIJA-ISASA, E.; DE CORTES, M.; FERREIRA, I. C. F. R. Phenolic Composition and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of hop (*Humulus lupulus* L.) seeds. **Industrial Crops and Products**, v.134, p.154–159, 2019.
- ALVES, Z.; MELO, A.; FIGUEIREDO A. R.; COIMBRA, M. A.; GOMES, A. C.; ROCHA, S. M. **Exploring the *Saccharomyces cerevisiae* volatile metabolome: Indigenous versus commercial strains**. **PLoS One**, v.10, n.11, p.1-16, 2015.
- ALVES, V.; GONÇALVES, J.; FIGUEIRA, J. A.; ORNELAS, L. P.; BRANCO, R. N.; CÂMARA, J. S.; PEREIRA, J. A. M. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. **Food Chemistry**, v. 326, 2020.
- AMBRA, R.; PASTORE, G.; LUCCHETTI, S. The Role of Bioactive Phenolic Compounds on the Impact of Beer on Health, **Molecules**, v.26, n.486, p.1-26, 2021.
- ANDERSON, H. E.; SANTOS, I. C.; HILDENBRAND, Z. L.; SCHUG, K. A. A Review of the Analytical Methods Used for Beer Ingredient and Finished Product Analysis and Quality Control. **Anal. Chim. Acta**, n.1085, p.1–20, 2019.
- APREA, E., BIASIOLI, F., AND GASPERI, F. Volatile compounds of raspberry fruit: From analytical methods to biological role and sensory impact, **Molecules**, v.20, p.2445– 2474, 2015.
- APROLÚPULO. **Conheça as regiões produtoras, Santa Catarina**. Disponível em: <<http://aprolupulo.com.br/>>. Acesso em: 28 mar. 2021.

AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. *Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos*. São Paulo: Blucher, 2001.

ARRANZ, S.; CHIVA-BLANCH, G.; VALDERAS-MARTINEZ, P.; MEDINAREMON, A.; LAMUELA-RAVENTOS, R.; Alcohol and Polyphenols on Cardiovascular Disease and Cancer. **Nutrients**, v.24, 2012.

ARON P. M., SHELLHAMMER T. H. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability, **J. Inst. Brew**, v.116, n.4, p.369–380, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CERVEJA ARTESANAL. **Cervejarias artesanais geraram mais de 1100 empregos em 2018**. Disponível em: <https://guiadacervejabr.com/artesanais-geraram-1114-empregos/>. Acesso em: 27/08/2022.

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

BARTH, R. The chemistry of beer : the science in the suds. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v.53, 2013.

BAUERLE, W.L. Disentangling photoperiod from hop vernalization and dormancy for global production and speed breeding. **Scientific Reports**, v.9, 2019.

BENUCCI, I.; CECCHI, T.; LOMBARDELLI, C.; MARESCA, D.; MAURIELLO, G.; ESTI, M. Novel microencapsulated yeast for the primary fermentation of green beer: kinetic behavior, volatiles and sensory profile. **Food Chemistry**, v.340, 2021.

BIENDL, M.; ENGELHARD, B.; FORSTER, A.; GAHR, A.; LUTZ, A.; MITTER, W.; SCHMIDT, R.; SCHÖNBERGER, C. **Hops: Their Cultivation, Composition and Usage**, Fachverlag Hans Carl, 2014.

BOKULICH, N. A.; BAMFORTH, C. W. The microbiology of malting and brewing. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 77, n. 2, p. 157-172, 2013.

BORONAT, A.; SOLDEVILA-DOMENECH, N.; RODRÍGUEZ-MORATÓ, J.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M.; DE LA TORRE, R. Beer Phenolic Composition of Simple Phenols, Prenylated Flavonoids and Alkylresorcinols. **Molecules**, v.25, n.11, p.1-11, 2020.

BRASIL. Decreto no 6.871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei no 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. **Diário Oficial**. Brasília, DF, 05 de jun. 2009.

BRUNELLI, L. T. **Produção de cerveja com mel: características físico-químicas, energética e sensorial**. 90f. 2012. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”: Botucatu, 2012.

CALLEMIEN, D.; JERKOVIC, V.; ROZENBERG, R.; COLLIN, S. Hop as an interesting source of resveratrol for brewers: optimization of the extraction and quantitative study by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **J Agric Food Chem**, v.53, n.2, p.424-429, 2005.

CARVALHO, D. O.; GUIDO, L. F. A review on the fate of phenolic compounds during malting and brewing: Technological strategies and beer styles. *Food Chemistry*, v.372, p.1-14, 2022.

CASTRO, R.; DÍAZ, A. B.; DURÁN-GUERRERO, E.; LASANTA, C. Influence of different fermentation conditions on the analytical and sensory properties of craft beers: Hopping, fermentation temperature and yeast strain. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.106, p.1-8, 2022.

CATOOR, K.; DRESEL, M.; BOCK, L.; BOUSSERY, K. Metabolism of Hop-Derived Bitter Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, n.33, p.7916-7924, 2013.

CEH, B.; KAC, M.; KOŠIR, I. J.; ABRAM, V. Relações entre xantohumol e conteúdo de polifenóis em folhas e cones de lúpulo em relação ao abastecimento de água e cultivar . **International Journal of Molecular Sciences** , v.8, n.9, p.989-1000, 2007.

CEOLA, D.; HUELSMANN, RICARDO DAGNONI ; DA-COL, J. A. ; MARTENDAL, EDMAR . Headspace-solid phase microextraction and GC-MS followed by multivariate data analysis to study the effect of hop processing type and dry hopping time on the aromatic profile of top-fermented beers. *Separation Science Plus*, v. 2, p. 245-252, 2019.

CERENAK, A.; KOLENC, Z.; SEHUR, P.; WHITTOCK, S.P.; KOUTOULIS, A.; BEATSON, R.; BUCK, E.; JAVORNIK, B.; ŠKOF, S.; JAKŠE, J.; New Male Specific Markers for Hop and Application in Breeding Program. **Scientific reports**, v.9, 2019.

CERMAK, P.; PALECKOVA, V.; HOUSKA, M.; STROHALM, J.; NOVOTNA, P.; MIKYSKA, A. Inhibitory effects of fresh hops on *Helicobacter pylori* strains. **Czech Journal of Food Sciences**, v.33, p.302-307, 2015.

CERQUEIRA, J. F. O. **Estratégias para Melhorar a Qualidade da Cerveja Artesanal – Análise de Pontos Críticos**. 2016. Dissertação de Mestrado (Mestrado Integrado em Engenharia Biológica Ramo Tecnologia Química e Alimentar). Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2016.

CERVBRASIL (2020) Dados do Setor. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor>. Acesso em: 05 jul.2020.

CERVBRASIL. **Anuário da Cerveja 2020**. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/wp-content/uploads/2021/04/anuariocerveja2.pdf. Acesso em: 02/09/2021

CHAGAS, E.; GARCIA, L. Lúpulo, crescendo muito bem no Brasil. **Revista da cerveja**, n.36, p.52-61, 2018.

CHIVA-BLANCH, G.; CONDINES, X.; MAGRANER, E.; ROTH, I.; VALDERAS-MARTÍNEZ, P.; ARRANZ, S.; CASAS, R.; MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; QUIFER-RADA, P.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; ESTRUCH, R. The Non-Alcoholic Fraction of Beer Increases Stromal Cell Derived Factor 1 and the Number of Circulating Endothelial Progenitor Cells in High Cardiovascular Risk Subjects: A Randomized Clinical Trial. **Atherosclerosis**, v.233, p.518–524, 2014.

CIBAKA, K.; MARIE-LUCIE, J. G.; NIZET, S.; COLLIN, S. Quantitation of selected terpenoids and mercaptans in the dualpurpose hop varieties amarillo, citra, hallertau blanc, mosaic, and sorachi ace. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n.11, p.3022–3030, 2015.

COMEX – Portal do comércio exterior do Brasil. Exportação e Importação geral. Disponível em: <<http://comexstat.mdic.gov.br/pt/geral/15604>>. Acesso em: 4 abr. 2021.

CURI, R. A. **Produção de cerveja utilizando cevada como adjunto de malte**. 2006. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2006.

DE KEUKELEIRE, D.; DE COOMAN, L.; RONG, H.; HEYERICK, A.; KALITA, J.; MILLIGAN, S. R.; Functional properties of hop polyphenols. **Basic Life Sci.**, v.66, p.739-760, 1999.

DI DOMENICO, M.; FEOLA, A.; AMBROSIO, P.; PINTO, F.; GALASSO, G.; ZARRELLI, A.; DI FABIO, G.; PORCELLI, M.; SCACCO, S.; INCHINGOLO, F. Antioxidant Effect of Beer Polyphenols and Their Bioavailability in Dental-Derived Stem Cells (D-dSCs) and Human Intestinal Epithelial Lines (Caco-2) cells. **Stem Cells Int**, 2020.

DOSTÁLEK, P.; KARABÍN, M.; JELÍNEK, L. Hop Phytochemicals and Their Potential Role in Metabolic Syndrome Prevention and Therapy. **Molecules**, v.22, n.10, p.1761. 2017.

DRAGONE, G.; SILVA, J. B. A. *Cerveja*. São Paulo: Blucher, 2010.

DRESEL, M.; VAN OPSTALE, F.; PRAET, T.; JASKULA-GOIRIS, B.; VAN HOLLE, A.; NAUDTS, D.; DE KEUKELEIRE, D.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. Investigation of the impact of the hop variety and the hopping technology on the analytical volatile profile of single-hopped worts and beers. **Brewing Science**, v. 66, p.162, 2013.

DURELLO, R. S.; SILVA, L. M.; BOGUSZ JÚNIOR, S. Química do lúpulo. **Quim. Nova**, v.42, n.8, p.900-919, 2019.

DUŠEK, M.; JANDOVSKÁ, V.; MIKYŠKA, A.; OLŠOVSKÁ, J. Novel and efficient approach to identify hop cultivars (*Humulus lupulus* L.) using cultivar identification diagram strategy based on fingerprint of flavonol Di- and Tri-O-glycosides. **European Food Research and Technology**, v.247, n.3, p.651–662, 2021.

EBLINGER, H. M. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Processes, Technology, Markets. Germany, Wiley-VCH, 2009.

EBLINGER, H. M.; NARZIB, L. **Beer, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH. v. 5, p. 178-220, 2012.

ELROD, S. M.; GREENSPAN, P.; HOFMEISTER, E. H. High Phenolic Beer Inhibits Protein Glycation in Vitro. **J. Am. Soc. Brew. Chem**, v.75, p.1–5, 2017.

ELROD, S. M. Relationship between Phenolic and Antioxidant Concentration of *Humulus lupulus* and Alpha Acid Content. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.77, n.2, p.134-139, 2019.

EMBRAPA. **A cevada no Brasil**. Disponível em: http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do139_4.htm. Acesso em: 02/09/2022.

ESSLINGER, H. M. **Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA., 2009.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica – EBC**. 5 ed. Zurique: Brauerei – und Getränke – Rundschau, 2005.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica-EBC**; Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, 2010.

EYRES, G. T.; MARRIOTT, P. J.; DUFOUR, J. P. Comparison of odor-active compounds in the spicy fraction of hop (*Humulus lupulus* L.) essential oil from four different varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.15, 6252–6261, 2007.

FAGUERAZZI, M. M. **Adaptabilidade de cultivares de lúpulo na região do Planalto Sul Catarinense**. 2020. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) Programa de Pós Graduação em Produção Vegetal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2020.

FARAG, M. A.; WESSJOHANN, L. A. Cytotoxic effect of commercial *Humulus lupulus* L. (hop) preparations: In comparison to its metabolomic fingerprint. **Journal of Advanced Research**, v.4, n.4, p.417-421 2013.

FORSTER, A.; GAHR, A. On the Fate of Certain Hop Substances during Dry Hopping. **Brewing Science**, v.66, p.93-103, 2013.

- FRITSCH, H. T.; SCHIEBERLE, P. Identification Based on Quantitative Measurements and Aroma Recombination of the Character Impact Odorants in a Bavarian Pilsner-type Beer. **J. Agr. Food Chem.**, v.53, p.7544–7551.
- GANBAATAR, C., KUBÁŇ, V., KRÁČMAR, S., VALÁŠEK, P., FIŠERA, M., HOZA, I. Liquid chromatographic determination of polyphenols in czech beers during brewing proces. **Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences**, v.9, n.1, p. 24-30, 2015.
- GASIOR, J.; KAWA-RYGIELSKA, J.; KUCHARSKA, A. Z. Carbohydrates Profile, Polyphenols Content and Antioxidative Properties of Beer Worts Produced with Different Dark Malts Varieties or Roasted Barley Grains. **Molecules**, v.25, n.17, p.3882, 2020.
- GOIRIS, K.; RIDDER, M.; ROUCK, G.; BOEYKENS, A.; OPSTAELE, F.; AERTS, G. The Oxygenated Sesquiterpenoid Fraction of Hops in Relation to the Spicy Hop Character of Beer. **J I Brewing**. v.10, n.1, p.86-93, 2002.
- GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M.M. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. **J. biol. Chem.**, v.177, p.751-66, 1949.
- GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; FARIA, J. D A.; CRUZ, A. G. Characterization of Brazilian Lager and Brown Ale Beers Based on Color, Phenolic Compounds, and Antioxidant Activity Using Chemometrics. **J. Sci. Food Agric**, v.91, p.563–571, 2011.
- GREEN, D. The Phenolic Phamily. Brew your own, The how to homebrew beer magazine, 2020. Disponível em: <https://byo.com/article/the-phenolic-phamily/>. Acesso em: 19/01/2022.
- GUIDO, L. F.; CURTO, A. F.; BOIVIN, P.; BENISMAIL, N.; GONÇALVES, C. R.; BARROS, A. A. Correlation of malt quality parameters and beer flavor stability: multivariate analysis. **J Agric Food Chem.**, v. 55, n. 3, p.728-733, 2007.
- HALEY, E.; DURBEN, D. J.; DIXSON, J. A.; ZEHFUS, M. H. A Multicomponent UV Analysis of α - and β -Acids in Hops. **Journal of Chemical Education**, v.89, p.117–120, 2012.
- HALEY, J.; PEPPARD, T. L. Differences in Utilization of the Essential Oil of Hops during the Production of Dry-hopped and Late-hopped Beers. **J. Inst. Brew.** v.89, p.87–91, 1983.
- HASLBECK, K.; MINKENBERG, D.; COELHAN, M. Investigations into the Transfer Rate of Volatile Compounds in Dry Hopping Using an Octanol-Water Partition Coefficient Model. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.76, n.6, p.1-9, 2018.

HAUSER, D. G.; VAN SIMAEYS, K. R.; LAFONTAINE, S. R.; SHELLHAMMER, T. H. A Comparison of Single-Stage and Two-Stage Dry-Hopping Regimes. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.77, n.4, p.251-260, 2019.

HIERONYMUS, S. **For The Love of Hops: The Practical Guide to Aroma, Bitterness and the Culture of Hops**, Lanham: National Book Network, 2012.

HOLT, S.; MIKS, M. H.; CARVALHO, B. T.; FOULQUIÉ-MORENO, M. R.; THEVELEIN, J. M. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. **FEMS Microbiology Reviews**, v.43, n.3, p.193-222, 2019.

HOPGUIDE. 2022. Disponível em:

https://brouwland.com/brldocs/additional_documents/Hop_EN.pdf. Acesso em: 16 out. 2022.

HUGHES, G. **Cerveja feita em casa**. Publifolha. 2014.

INIGUEZ, A.B.; ZHU, M.J. Hop bioactive compounds in prevention of nutrition-related noncommunicable diseases. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.60, p.1–14. 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**.

4.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. E-book. Disponível em:

<https://wp.ufpel.edu.br/nutricaoobromatologia/files/2013/07/NormasADOLFOLUTZ.pdf>. Acesso em: 16 out. 2016.

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERAÇÃO PARA A AGRICULTURA.

Brasil se prepara para expandir cultivo de lúpulo, 2021. Disponível em:

<https://iica.int/pt/prensa/noticias/brasil-se-prepara-para-expandir-cultivo-de-lupulo>.

Acesso em: 06/01/2021

INTELMANN, D.; HASELEU, G.; DUNKEL, A.; LAGEMANN, A.; STEPHAN, A.; HOFMANN, T. Comprehensive sensomics analysis of hop-derived bitter compounds during storage of beer. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.59, n. 5, p.1939-1953, 2011.

INTERNATIONAL HOP GROWERS CONVENTION (IHGC), ECONOMIC

COMMISSION - SUMMARY REPORTS ŽALEC, SLOVENIA JULY, 2020, Disponível em: https://www.usahops.org/img/blog_pdf/236.pdf. Acesso em 01 jun de 2021.

INUI, T.; TSUCHIYA, F.; ISHIMARU, M.; OKA, K.; KOMURA, H. Different Beers with Different Hops. Relevant Compounds for Their Aroma Characteristics. **J. Agric. Food Chem**, v.61, p.4758-4764, 2013.

JANDERA, P. **Methods for HPLC analysis of phenolics compounds and**

flavonoids in beer. In: **Preddy, V. R. (org.) Beer in Health and Disease Prevention**.

: Elsevier, 1003-1014, 2009.

JASKULA-GOIRIS, B.; DE CAUSMAECKER, B.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; PATERNOSTER, A.; BRAET, J.; DE COOMAN, L. Influence of Transport and

Storage Conditions on Beer Quality and Flavour Stability. **J. Inst. Brew**, v.125, p.60-68, 2019.

JASKULA-GOIRIS, B.; GOIRIS K.; SYRYN, E.; OPSTAELE, F. V.; DE ROUCK, G.; AERTS, G.; DE COOMAN, L. The Use of Hop Polyphenols During Brewing to Improve Flavor Quality and Stability of Pilsner Beer. **J. Am. Soc. Brew. Chem**, v.72, n.3, p.175-183, 2014.

JASKULA, B.; KAFARSKI, P.; AERTS, G.; COOMAN, L. A kinetic study on the isomerization of hop α -acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6408-6415, 2008.

KARABIN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biologically Active Compounds from Hops and Prospects for Their Use. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n.3, 2016.

KIM, D.; WOO, H.; KIM, J.; RYUK, J.; PARK, K; KO, B. Phenols displaying tyrosinase inhibition from *Humulus lupulus*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.31, p.742-747, 2016.

KISHIMOTO T.; KOBAYASHI, M.; YAKO, N.; IIDA, A.; WANIKAWA, A. Comparison of 4-Mercapto-4-Methylpentan-2-one contents in hop cultivars from different growing regions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.3, 1051–1057, 2008.

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A.; & HAŠKOVÁ, D. Antioxidant characteristics of hops and hop products. **Journal of the Institute of Brewing**, v.114, n.2, p.160–166, 2008.

KUNZE, W. **Tecnología para Cerveceros y Malteros**. 1ed, Berlin: VLB, 2006.

LAFONTAINE, S.R.; SHELLHAMMER, T.H. Impact of statistic dry-hopping rate on the sensory and analytical profiles of beer. **Journal of the Institute of Brewing**, v.124, p.434-442, 2018.

LAM, K. C.; FOSTER, R. T.; DEINZER, M. L. Aging of hops and their contribution to beer flavor. **J. Agric. Food Chem.**, v.34, n.4, p.763–770, 1986.

LIMA, L. L. A.; FILHO, A. B. M. Técnico em alimentos: tecnologia de bebidas, 2011.

LIU, M.; HANSEN, P.; WANG, G.; QUI, L.; DONG, J.; YIN, H. Pharmacological profile of xanthohumol a prenylated flavonoid from hops (*H. lupulus*). **Molecules**, v.20, p. 754-779, 2015.

LUGASI, A. Polyphenol contents and antioxidant properties of beer, **Acta Alimentaria**, v.32, p.181–192, 2003.

MARTINEZ-GOMEZ, A.; CABALLERO, I.; BLANCO, C.A. Phenols and Melanoidins as Natural Antioxidants in Beer. Structure. Reactivity and Antioxidant Activity. **Biomolecules**, v.10, n.3, p.400, 2020.

- MASTANJEVIC, K.; KRSTANOVIC, V.; LUKINAC, J.; JUKIC, M.; VULIN, Z.; MASTANJEVIC, K. Beer-The Importance of Colloidal Stability (Non-Biological Haze). **Fermentation**, v.4, p.91, 2018.
- MAYE, J. P.; SMITH, R. AND LEKER, J. Humulinone Formation in Hops and Hop Pellets and Its Implications for Dry Hopped Beers. **Masters Brewers Association of the Americas**, v.53, n. 3, p. 134-136, 2016.
- MCLAUGHLIN, I.R.; LEDERER, C.; SHELLHAMMER, T.H. Bitterness-Modifying Properties of Hop Polyphenols Extracted from Spent Hop Material. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.66, n.3, p.174-183, 2008.
- MEDA, A.; LAMIEN, C.E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O.G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chem**, v.91: 571-577, 2005.
- MIKYŠKA, A., & KROFTA, K. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. **Journal of the Institute of Brewing**, v.118, n.3, p.269–279, 2012.
- MITIĆ, S. S.; PAUNOVIĆ, D. Đ.; PAVLOVIĆ, A.; TOŠIĆ, S.B.; STOJKOVIĆ, M.B.; MITIĆ, M. Phenolic Profiles and Total Antioxidant Capacity of Marketed Beers in Serbia. **Int. J. Food Prop**, v.17, p.908–922, 2013.
- MORADO, R. **Larousse da cerveja: a história e as curiosidades de uma das bebidas mais populares do mundo**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2017.
- MOZNY, M.; TOLASZ, R.; NEKOVAR, J.; SPARKS, T.; TRNKA, M.; ZALUD, Z. The impact of climate change on the yield and quality of saaz hops in the Czech Republic. **Agricultural and Forest Meteorology**, v.149, n.6, p.913–919, 2009.
- NACHEL, M.; ETTLINGER, S.; **Beer for Dummies**, 2ed., Wiley: New Jersey, 2012.
- NARDINI, M; FODDAI, M.E. Phenolics Profile and Antioxidant Activity of Special Beers. **Molecules**, v.25, n.11, p.2466, 2021.
- NEUGRODDA, C.; GASTL, M.; & BECKER, T. Protein Profile Characterization of Hop (*Humulus lupulus* L.) Varieties. **J. Am. Soc. Brew. Chem**, v.72, n.3, p.184-191, 2014.
- NICKERSON, G. B.; Varietal Differences in the Proportions of Cohumulone, Adhumulone, and Humulone in Hops. **J. Am. Soc. Brew. Chem**, v.44, p.91–94, 1986.
- NIMUBONA, D.; BLANCO, C. A.; CABALLERO, I.; ROJAS, A.; ANDRÉS-IGLESIAS, C. An approximate shelf life prediction of elaborated lager beer in terms of degradation of its iso- α -acids. **Journal of Food Engineering**, V.116, p.138–143. 2013.
- NTOURTOGLOU, G.; TSAPOU, E. A.; DROSOU, F.; BOZINOI, E.; LALAS, S.; TATARIDIS, P.; DOURTOGLOU, V. Pulsed electric field extraction of α and β -acids

from pellets of *Humulus lupulus* (Hop). **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, n.8, p.143, 2020.

OBERHOLSTER, A.; BRADLEY, M. T. Review: Impact of Dry Hopping
OLADOKUN, O. JAMES, S., COWLEY, T., SMART, K., HORT, J. & COOK, D.: Dry-hopping: The Effects of Temperature and Hop Variety on the Bittering Profiles and Properties of Resultant Beers. **BrewingScience**, v.70, n.11/12, p. 187-196, 2017.

OLANIRAN, A. O.; HIRALAL, L.; MOKOENA, M. P.; PILLAY, B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. **Journal of the Institute of Brewing**, v.123, n.1, p. 13-23, 2017.

OLIVEIRA, M.; FABER, C. R.; PLATA-OVIEDO, M. S. V. Elaboração de Cerveja Artesanal a Partir da Substituição Parcial do Malte por Mel. **Brazilian Journal of Food Research**, v.6, n.3, p.1-10, 2015.

OLIVEIRA, T de. **Avaliação do comportamento de amidos de batata oxidados e utilizados como clarificantes na produção de cerveja artesanal**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia de Alimentos), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Campo Mourão. 2016.

OSORIO-PAZ, I.; BRUNAUER, R.; ALAVEZ, S. Beer and its non-alcoholic compounds in health and disease. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** p.1–14, 2019

PADGITT-COBB, L.K.; KINGAN, S.B.; WELLS, J.; ELSER, J.; KRONMILLER, B.; MOORE, D.; CONCEPCION, G.; PELUSO, P.; RANK, D.; JAISWAL, P.; HENNING, J.; HENDRIX, D.A.; A draft phased assembly of the diploid Cascade hop (*Humulus lupulus*) genome. **Plant Genome** v.14(e):20072, p.1-22, 2021.

PALAMAND, S. R.; ALDENHOFF, J. M. Bitter tasting compounds of beer: Chemistry and taste properties of some hop resin compounds, **J. Agric. Food Chem**, v.21, p.535– 543.

PAUNOVIC, D.Đ.; MITIĆ, S.S.; STOJANOVIĆ, G.S.; MITIĆ, M.N.; STOJANOVIĆ, B.T.; STOJKOVIĆ, M.B. Kinetics of the Solid-Liquid Extraction Process of Phenolic Antioxidants and Antioxidant Capacity from Hop (*Humulus lupulus* L. **Separ. Sci. Technol**, v.50, p.1658–1664, 2015.

PEACOCK, V. E.; DEINZER, M. L. Chemistry of Hop Aroma in Beer. **J Am Soc Brew Chem**. v.39, n.4, 136-141, 1981.

PINTO, M. D. C. **Isomerização de ácidos amargos de lúpulo cascade cultivado no Brasil e seu desempenho durante a fermentação da cerveja**. 2018. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) Programa de Pós Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, 2018.

PRAET, T.; OPSTAELE, F.; CAUSMAECKER, B.; BELLAIO, G.; ROUCK, G.; AERTS, G.; COOMAN, L. Formation of sesquiterpene Oxidation Products during wort boiling and impacts of the Kettle Hopping Regime on Sensory Characteristics of Pilot Scale Lager Beers. **Brew. Sci.**, 68, 130–145, 2015.

PREEDY, V. R. **Beer in health and disease prevention**, Burlington: Elsevier, 2009.

QUIFER-RADA, P.; VALLVERDU-QUERALT, A.; MARTINEZ-HU ELAMO, M.; CHIVA-BLANCH, G.; JAUREGUI, O.; ESTRUCH, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. A. Comprehensive Characterisation of Beer Polyphenols by High Resolution Mass Spectrometry (LC–ESI-LTQ-OrbitrapMS). *Food Chem*, 2015.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 02 jun. 2018.

RETTBERG, N. ; BIENDL, M.; GARBE , L.; J. **A química da cerveja** . São Paulo: Quím. Nova esc., 2015.

RETTBERG, N.; BIENDL, M.; GARBE, L. A. Hop aroma and hoppy beer flavor: chemical backgrounds and analytical tools: a review. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.76, n.1, p.1-20, 2018.

RNC, 2021 – Registro Nacional de Cultivares.

http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php

RODRIGUES, F., CALDEIRA, M., AND CAMARA, J. S. Development of a dynamic headspace solid-phase microextraction procedure coupled to GC–qMSD for evaluation the chemical profile in alcoholic beverages, **Anal. Chim. Acta**, v.609, p.82– 104, 2008.

ROSALIN, J. P; GALLO, F. O setor cervejeiro no Brasil: distribuição e consumo como importantes etapas do circuito espacial da produção das cervejas especiais. In: Simpósio Nacional de Geografia Urbana, 2017. Salvador. **Anais...** p.1-7, 2017.

ROVALETTI, M. M. L., BENÍTEZ, E. I., AMEZAGA, N. M. J. M., PERUCHENA, N. M., SOSA, G. L., & LOZANO, J. E. Polysaccharides influence on the interaction between tannic acid and haze active proteins in beer. **Food Research International**, v.62, p.779-785, 2014.

SALAMON, R. V.; DABIJA, A.; FERENCZ, A.; TANKÓ, G.; CIOCAN, M. E.; CODINA, G. G. The Effect of Dry Hopping Efficiency on β -Myrcene Dissolution into Beer. **Plants**, v.11, n.11, p.1-14, 2022.

SANZ, V., TORRES, M. D., VILARINO, J. M. L., & DOMINGUEZ, H. What is new on the hop extraction? **Trends in Food Science & Technology**, v.93, p.12– 22. 2019.

SCHNAITTER, M.; KELL, A.; KOLLMANNNSBERGER, H.; SCHUELL, F. Scale-up of Dry Hopping Trials: Importance of Scale for Aroma and Taste Perceptions. **Chemie Ingenieur Technik**, v.88, n.12, p. 1955-1965, 2016.

SCHÖNBERGER, C.; KOSTELECKY, T. 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. **J Inst Brew**, v.117, n.3, p.259-267, 2011.

- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Microcervejarias ganham espaço no mercado nacional**. Disponível em < <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/microcervejarias-ganham-espaco-nomercado-nacional,fbe9be300704e410VgnVCM1000003b74010aRCRD>>. Acesso em 27/03/2019.
- SIEBERT, K. J., TROUKHANOVA, N. V. AND LYNN, P. Y., Nature of polyphenol-protein interactions. **J. Agr. Food Chem.**, v.44, n.1, p.80-85. 1996
- SILVA, M. C.; ANJOS, J. P.; GUARIERO, L. L. N.; MACHADO, B. A. S. A Simple Method for Evaluating the Bioactive Phenolic Compounds' Presence in Brazilian Craft Beers. **Molecules**, v.26, p.1-16, 2021.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents, **Am J Enol Vitic**, v.16, p.144-158, 1965.
- SIQUEIRA, P.B.; BOLINI, H.M.A.; MACEDO, G.A.; O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alim. Nutr.**, v.19, n.4, p. 491-498, 2008.
- SMITH, R. J.; WILSON, D. D.; WILSON, R. J. H. The influence of naturally occurring hop acids on the BU analyses of dry-hopped beers. **World Brewing Congress**, 2004.
- STEENACKERS, B.; COOMAN, L.; VOS, D. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: a review. **Food Chemistry**, v.1, n.72, p.742-756, 2015.
- STEINER, E.; BECKER, T.; GASTL, M. Turbidity and Haze Formation in Beer – Insights and Overview. **J. Inst. Brew**, v.116, n.4, p.360–368, 2010.
- STEINHAUS, M.; SCHIEBERLE, P. Comparison of the most odor-active compounds in fresh and dried hop cones (*Humulus lupulus* L. Variety Spalter Select) based on GC-Olfactometry and odor dilution techniques. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n.5, p.1776–1783, 2000.
- TAKOI, K.; ITOGA, Y.; KOIE, K.; TAKAYANAGI, J.; KANEKO, T.; WATANABE, T.; MATSUMOTO, I.; NOMURA, M. Systematic analysis of behaviour of hop-derived monoterpene alcohols during fermentation and new classification of geraniol-rich flavour hops. **Brew. Sci.**, v.70, p.177-186, 2017.
- TAKOI, K.; KOIE, K.; ITOGA, Y.; KATAYAMA, Y.; SHIMASE, M.; NAKAYAMA, Y.; WATARI, J. Biotransformation of Hop-derived Monoterpene Alcohols by Lager Yeast and Their Contribution to the Flavor of Hopped Beer. **J. Agr. Food Chem.**, v.58, p.5050–5058, 2010.
- TAKOI, K.; ITOGA, Y.; KOIE, K.; KOSUGI, T.; SHIMASE, M.; KATAYAMA, Y. The Contribution of Geraniol Metabolism to the Citrus Flavour of Beer: Synergy of

Geraniol and β -Citronellol Under Coexistence with Excess Linalool. **J I Brewing**, v.116, n.3, p.251-260, 2010

TING, P. L.; RYDER, D. S. The Bitter, Twisted Truth of the Hop: 50 Years of Hop Chemistry. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.75, n.3, p.161-180, 2018.

TITUS, B. M; LERNO, L. A; BEAVER, J. W; BYRNES, N. K; HEYMANN, H; OBERHOLSTER, A. Impact of Dry Hopping on Beer Flavor Stability. **Foods**, v.10, n.6, p.1264, 2021.

VAN DEN DOOL, H.; DEC. KRATZ, P. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463–471, 1963.

VAN OPSTAELE, F.; VAN LANDSCHOOT, A.; ROLDÁN-RUIZ, I.; NAUDTS, D.; DE KEUKELEIRE, D. Characterization of novel varietal floral hop aromas by headspace solid phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry. **J. Agric. Food Chem.**, v.60, p.12270–12281, 2012.

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

VENTURINI FILHO, W. G. **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, v.1, 461 p., 2010.

VENTURINI FILHO, W.G. **Tecnologia de cerveja**. Funep: Botucatu, 2000. 83p.

VOLLMER, D. M.; SHELLHAMMER, T. H. Influence of Hop Oil Content and Composition on Hop Aroma Intensity in Dry-Hopped Beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v.74, n.4, p.242-249, 2016.

WANG, G.; TIAN, L.; AZIZ, N.; BROUN, P.; DAI, X.; HE, J.; KING, A.; ZHAO, P. X.; DIXON, R. A.; Terpene biosynthesis in glandular trichomes of hop. **Plant Physiol**, v.148, p.1254, 2008.

WANNENMACHER, J.; GASTL, M.; BECKER, T. Phenolic Substances in Beer: Structural Diversity, Reactive Potential and Relevance for Brewing Process and Beer Quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.17, n.4, p.1-36, 2018.

WOFFENDEN, H. M.; AMES, J.M.; CHANDRA, S. Relationships between antioxidant activity, color, and flavor compounds of crystal malt extracts. **J Agric Food Chem.**, v.49, n.11, p.5524-5530, 2001.

WOLFE, P.; QIAN, M. C.; SHELLHAMMER, T. H. The Effect of Pellet Processing and Exposure Time on Dry Hop Aroma Extraction. **American Chemical Society**, p.204-215, 2016.

WOODSKE, D. Hop Variety Handbook: Learn More About Hops...Create Better Beer. CreateSpace **Independent Publishing Platform**, 2012.

YAN, D.; WONG, Y. F.; SHELLIE, R. A.; MARRIOTT, P. J.; WHITTOCK, S. P.; KOUTOULIS, A. Assessment of the phytochemical profiles of novel hop (*Humulus lupulus* L.) cultivars: A potential route to beer crafting. **Food Chemistry**, v.275, p.15-23, 2019.

ZHAO, H. Effects of Processing Stages on the Profile of Phenolic Compounds in Beer, 2015.

ZHAO, H.; CHEN, W.; LU, J.; ZHAO, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, v.119, n.3, p.1150–1158, 2010.

ZUFALL, C.; GASPARRI, M.; FRANQUÍZ, J.; RACIOPPI, G. Flavour stability and ageing characteristics of light-stable beers. EBC Congres. (Prague), p.617-624, 2005.

10 APÊNDICES

APÊNDICE A – Média das características: amargor (AM) (IBU); açúcares redutores (AR) (mg L^{-1}); teor alcoólico (TA) (%); pH; acidez total (AT) (meq L^{-1}); sólidos solúveis totais (SST) ($^{\circ}\text{Brix}$); proteínas (PRO) (mg L^{-1} caseína); flavonoides (FLA) (mg L^{-1} quercetina); compostos fenólicos totais (CFT) (mg L^{-1} ácido gálico) e atividade antioxidante (AA) (mmol L^{-1} Trolox) para as cervejas produzidas com a técnica de dry hopping utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.

Concentração de Lúpulo <i>Dry Hopping</i> (g L^{-1})	Origem	AM	AR	TA	pH	AT	SST	PRO	FLA	CFT	AA
0	-	55,1	5,43	4,85	4,47	23,73	5,76	7,37	51,73	652,53	2317,14
2	Brasil	54,5	9,15	4,95	4,52	23,57	5,00	7,21	49,26	653,68	2831,42
4	Brasil	59,8	6,65	4,50	4,62	22,74	5,80	6,88	55,70	661,15	3300,00
6	Brasil	60,5	6,18	4,55	4,63	22,84	5,67	8,54	72,51	761,08	3840,00
8	Brasil	64,9	10,31	4,50	4,73	22,36	5,87	8,13	76,22	874,21	3920,00
2	Estados Unidos	54,8	6,49	4,65	4,52	27,59	5,40	6,85	50,27	761,08	2777,14
4	Estados Unidos	63,0	8,73	4,50	4,59	24,28	6,00	7,60	72,51	773,71	2977,14
6	Estados Unidos	59,5	7,47	4,76	4,62	24,35	5,83	7,55	76,22	778,31	2991,41
8	Estados Unidos	67,8	6,93	4,85	4,63	24,35	5,53	6,93	56,90	726,04	2997,14

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE B – Média das características avaliadas pelo painel sensorial: consistência da espuma (CE); estabilidade da espuma (EE); carbonatação (CA); teor alcoólico (TA); acidez total (AT); amargor (AM); corpo (CO) para as cervejas produzidas com a técnica de dry hopping utilizando lúpulo “Comet” importado ou brasileiro em diferentes concentrações.

Concentração de Lúpulo <i>Dry Hopping</i> (g L ⁻¹)	Origem	CE	EE	CA	TA	AT	AM	CO
0	-	2,35	2,43	2,46	2,68	2,76	3,46	2,9
2	Brasil	3,87	3,86	3,76	2,68	2,36	2,98	3,02
4	Brasil	4,43	4,21	3,98	2,57	2,1	3,32	2,79
6	Brasil	3,13	3,34	2,57	3,22	2,65	3,76	3,1
8	Brasil	4,32	3,87	3,42	2,79	2,56	3,42	2,99
2	Estados Unidos	2,90	2,68	3,65	2,35	2,56	2,65	2,88
4	Estados Unidos	2,90	3,43	3,32	2,79	2,79	3,65	3,13
6	Estados Unidos	3,21	2,79	2,68	2,46	2,57	3,43	2,87
8	Estados Unidos	3,76	4,20	3,31	2,46	2,02	3,76	3,1

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE C – Áreas de pico normalizadas para os compostos voláteis identificados via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em cervejas produzidas com a técnica de *dry hopping* utilizando lúpulo “Comet” brasileiro ou importado em diferentes concentrações.

Concentração (g/L)	Origem								
	Brasil				Estados Unidos				
	0	2	4	6	8	2	4	6	8
Compostos									
Álcool Isoamílico	3,352	2,035	2,834	3,188	2,899	2,633	2,836	3,074	3,076
2-metilbutanol	0,668	0,477	0,657	0,617	0,667	0,501	0,550	0,606	0,651
Tolueno	1,854	1,612	1,538	1,853	1,570	1,842	1,580	1,601	2,000
Butanoato de Etila	0,134	0,074	0,078	0,105	0,081	0,104	0,076	0,087	0,129
Ethylbenzene	0,214	0,152	0,185	0,203	0,214	0,225	0,160	0,179	0,287
Acetato de Isoamila	1,203	0,793	0,724	0,959	0,696	0,874	0,672	1,003	1,071
Acetato de 2-metilbutila	0,312	0,217	0,261	0,387	0,356	0,390	0,286	0,305	0,456
Isobutyl isobutanoate	0,049	0,168	0,213	0,348	0,352	0,263	0,086	0,125	0,301
Mesitylene	718,130	0,174	0,211	0,275	0,266	0,213	0,176	0,214	0,261
2,6-dimethyl-4-heptanone	0,303	0,286	0,314	0,330	0,368	0,305	0,310	0,257	0,340
2-pentyl propanoate	0,148	0,120	0,171	0,267	0,329	0,228	0,168	0,193	0,333
b-pinene	0,287	0,337	0,413	0,605	0,804	0,564	0,324	0,402	0,706
Hexanoato de Etila	0,293	0,236	0,241	0,280	0,265	0,220	0,215	0,249	0,307
Isoamyl isobutanote	0,143	0,170	0,209	0,276	0,299	0,213	0,152	0,173	0,281

Não Identificado	0,382	0,673	0,711	0,896	0,943	0,577	0,458	0,510	0,740
Propyl tiglate	0,233	0,621	0,788	1,028	1,310	0,529	0,427	0,474	0,846
(E)-b-ocimene	0,018	0,029	0,035	0,037	0,060	0,031	0,021	0,017	0,062
(Z)-b-ocimene	0,021	0,041	0,051	0,056	0,069	0,046	0,033	0,031	0,073
2-nonanone	0,115	0,150	0,221	0,176	0,314	0,157	0,121	0,102	0,289
6-camphenone	0,120	0,281	0,364	0,404	0,496	0,186	0,215	0,226	0,368
Álcool Fenil Etilico	2,329	2,006	2,415	1,765	2,747	1,271	2,392	2,098	1,850
Não Identificado	0,853	0,200	0,202	0,267	0,317	0,984	0,359	0,151	0,125
Terpinen-4-ol	0,110	0,122	0,194	0,163	0,199	0,127	0,130	0,134	0,252
Octanoato de Etila	0,107	0,050	0,120	0,140	0,144	0,081	0,107	0,159	0,149
Citronellol	0,491	0,503	0,550	0,608	0,659	0,466	0,643	0,533	0,633
Geraniol	0,225	0,485	0,566	0,486	0,544	0,334	0,297	0,360	0,449
Phenylethyl acetate	0,448	0,438	0,381	0,569	0,425	0,358	0,333	0,432	0,518
Methyl geranate	0,667	0,489	0,510	0,611	0,610	0,553	0,487	0,618	0,800
Citronellyl acetate	0,175	0,142	0,150	0,188	0,114	0,119	0,115	0,156	0,260
Geranyl acetate	0,285	0,669	0,627	0,913	0,600	0,617	0,408	0,668	0,660
Decanoato de Etila	0,160	0,200	0,827	0,269	0,875	0,349	0,359	0,198	0,137
b-caryophyllene	0,022	0,005	0,009	0,018	0,064	0,026	0,015	0,016	0,060
Não Identificado	0,063	0,059	0,073	0,107	0,080	0,074	0,053	0,074	0,083
γ-gurjunene	0,013	0,053	0,041	0,074	0,052	0,028	0,014	0,030	0,019
γ-cadinene	0,052	0,035	0,047	0,057	0,075	0,065	0,044	0,050	0,089
Cis-calamenene	0,052	0,018	0,028	0,037	0,047	0,034	0,032	0,026	0,061
Não Identificado	0,049	0,030	0,038	0,053	0,043	0,053	0,040	0,047	0,074

Spathulenol	0,104	0,099	0,082	0,093	0,095	0,095	0,113	0,072	0,087
Dodecanoato de Etila	0,368	0,274	0,228	0,456	0,190	0,167	0,280	0,358	0,317
1-epi-cubenol	0,060	0,040	0,053	0,067	0,065	0,092	0,056	0,072	0,100
Cubenol	0,107	0,078	0,100	0,115	0,084	0,099	0,099	0,109	0,126
Valerianol	0,170	0,097	0,134	0,142	0,125	0,161	0,167	0,165	0,212

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNCIDE D - Média das características: pH; acidez total (AT) (meq L^{-1}); açúcares redutores (AR) (mg L^{-1}); flavonoides (FLA) (mg L^{-1} quercetina); compostos fenólicos totais (CFT) (mg L^{-1} ácido gálico); cor (EBC); amargor (AM) (IBU); proteínas (PRO) (mg L^{-1} caseína); e atividade antioxidante (AA) (mmol L^{-1} Trolox) em cervejas produzidas com diferentes cultivares e locais de origem.

Cultivar	Origem	pH	AT	AR	FLA	CFT	COR	AMA	PRO	AA
Comet	Brasil	4,60	45,79	9,58	40,45	601,42	12,93	32,26	5,45	4910,00
Comet	Estados Unidos	4,50	46,45	10,63	39,15	689,29	15,33	24,00	5,35	4130,00
Fuggle	Brasil	4,61	31,45	12,47	95,07	850,09	18,26	14,13	5,02	6890,00
Fuggle	Estados Unidos	4,54	40,58	9,55	54,16	798,41	16,26	22,78	5,27	6055,00

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE E – Áreas de pico para os compostos voláteis identificados via cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas em cervejas produzidas com diferentes cultivares e locais de origem do lúpulo

Origem	Cultivares			
	Fuggle		Comet	
	Importado	Brasileiro	Importado	Brasileiro
Compostos				
isoamyl alcohol	4,82	4,64	7,79	5,90
2-methylbutanol	0,82	0,73	1,08	0,75
4-methyl-2-pentanol	0,92	0,93	1,21	1,04
Ethyl butanoate	0,06	0,07	0,11	0,10
Ethylbenzene	0,03	0,01	0,03	0,03
Isoamyl acetate	0,29	0,36	0,51	0,55
2-methylbutyl acetate	0,10	0,13	0,13	0,12
isobutyl isobutanoate	0,01	0,13	0,03	0,04
Mesitylene	0,08	0,12	0,18	0,11
2,6-dimethyl-4-heptanone	0,23	0,21	0,24	0,20
b-pinene	0,09	0,08	0,16	0,22
Ethyl hexanoate	4,90	4,77	4,29	4,35
propyl tiglate	0,10	0,09	0,19	0,41
(E)-b-ocimene	0,01	0,01	0,02	0,05
(Z)-b-ocimene	0,02	0,01	0,04	0,07
phenyl ethyl alcohol	5,77	3,28	4,18	2,45
ethyl octanoate	19,38	15,86	24,13	9,44
citronellol	0,41	0,29	2,01	2,28
Geraniol	0,06	0,06	0,59	0,66
Phenylethyl acetate	0,13	0,07	0,40	0,37
Methyl geranate	0,10	0,07	0,12	0,21
Geranyl acetate	0,13	0,32	0,72	1,23
Ethyl decanoate	1,15	1,93	8,05	4,57
y-gurjunene	0,03	0,01	0,11	0,10
y-cadinene	0,01	0,01	0,08	0,04
ethyl dodecanoate	0,07	0,31	0,87	0,48
1-epi-cubenol	0,03	0,02	0,13	0,06
Cubenol	0,05	0,02	0,16	0,11
Valerianol	0,10	0,02	0,12	0,07

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

APÊNDICE F – Média de cinco períodos de avaliação das características: compostos fenólicos totais (CFT) (mg L^{-1} ácido gálico); flavonoides (FLA) (mg L^{-1} quercetina); proteínas (PRO) (mg L^{-1} caseína); turbidez (NTU); pH e acidez total (AT) (meq L^{-1}) em cervejas estilo IPA produzidas com diferentes cultivares de lúpulo brasileiro em flor desidratado (Cascade; Chinook e Columbus).

Cultivares	CFT	FLA	PRO	TUR	pH	ATT
Cascade	466,06	108,38	6,00	226,67	4,62	28,42
Chinook	450,40	110,53	6,20	301,27	4,63	26,54
Columbus	360,90	99,03	5,44	231,93	4,60	26,86

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

11 ANEXOS

ANEXO A - Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado de Santa Catarina. Lages, UDESC, 2022.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Agregação de valor de produtos agrícolas através de bebidas fermentadas na Serra Catarinense

Pesquisador: LEO RUFATO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 46216621.8.0000.0118

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SC UDESC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.859.714

Apresentação do Projeto:

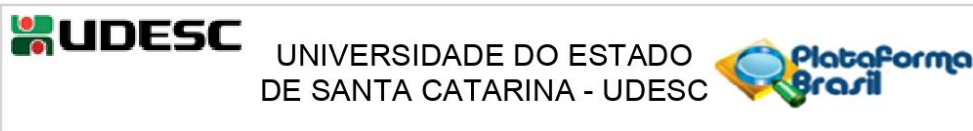
Trata-se da segunda versão apresentada ao CEP de um protocolo que abrange pesquisas dos cursos de mestrado e doutorado, vinculadas ao Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal da Universidade do Estado de Santa Catarina – Centro de Ciências Agroveterinárias (UDESC/CAV), intitulado “Agregação de valor de produtos agrícolas através de bebidas fermentadas na Serra Catarinense”, tendo como pesquisador responsável: Leo Furtado e como equipe de pesquisa/assistentes: Deivid Silva de Souza, Cristiane Rota, Adrielen Tamiris Canossa, Ana Luiz Arruda.

Participantes da pesquisa: 70. Os participantes selecionados para a realização da etapa de análise sensorial serão pesquisadores da área de fruticultura e enólogos da instituição que faz parte da pesquisa, ou seja, UDESC/CAV.

Instrumentos de pesquisa: será realizada a análise visual, olfativa e gustativa, segundo metodologia proposta por Madrera, et al. (2010), cuja análise será submetida a aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa da Udesc. Porém não foi apresentado o instrumento de coleta de dados (ficha de avaliação).

Metodologia de coleta de dados: "As avaliações sensoriais serão realizadas em laboratório do

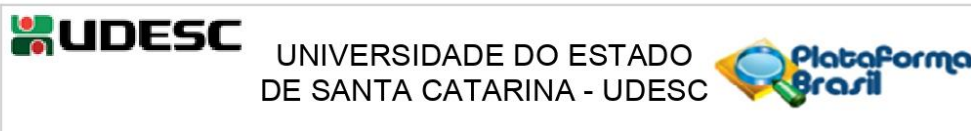
Endereço: Av Madre Benvenutta, 2007
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-8084 **E-mail:** cep.udesc@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.859.714

Departamento de Agronomia da Universidade do Estado de Santa Catarina, em cabines individuais. Cada subprojeto realizará a análise sensorial individual em uma data previamente estabelecida, após o término da pandemia. As amostras de vinhos, sidra e cerveja vão ser servidas em copos descartáveis de 50mL, em bandejas plásticas, à temperatura de 10°C, codificados com números aleatórios de três dígitos, juntamente com um copo de água, para enxaguar a boca entre as avaliações. Voluntários para compor a equipe sensorial serão recrutados entre estudantes e funcionários da Universidade do Estado de Santa Catarina. O recrutamento será realizado por meio de questionário, com o objetivo de obter informações a respeito das condições de saúde, da habilidade para quantificar usando escalas de intensidade, da disponibilidade de tempo, da familiaridade com termos descritivos e do interesse em participar do teste. A habilidade discriminatória dos candidatos vai ser testada por meio do método triangular (teste discriminatório), em que serão utilizadas apresentadas e avaliadas três amostras, sendo uma diferente e duas iguais, nas quais os provadores vão ser solicitados a identificar a amostra diferente. Os provadores selecionados serão treinados por duas semanas onde serão oferecidas amostras com intensidades extremas das características de modo a propiciar uma familiarização com todos os atributos sensoriais do produto. A ficha de avaliação vai conter uma escala não-estruturada para cada termo descritivo levantado. A escala será composta de uma linha de 15cm, com expressões quantitativas (pontos âncoras) nas extremidades esquerda e direita. Os provadores vão escolher a posição que melhor refletir sua avaliação para cada termo descritivo, e marcar esta posição com uma marca vertical. Os provadores vão avaliar as amostras dos 10 vinhos tintos, 10 vinhos brancos, 10 sidras e 20 cervejas (em datas distintas), por meio de atributos. No teste de aceitação serão utilizadas as amostras para avaliar a aceitação do produto. As amostras serão servidas a 10°C, em copos descartáveis de 50mL. O teste será realizado em condições laboratoriais, e cada amostra será analisada, individualmente, por 50 consumidores de cerveja, através de escala hedônica de 9 pontos, sendo 1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente. Por fim, será realizada a análise sensorial com um painel expert de degustadores com técnicos treinados para avaliar as amostras. O treinamento dos julgadores será de duas a três semanas e a análise sensorial das amostras será realizada em 4 semanas, devido ao grande número de amostras, para que não haja saturação do paladar dos degustadores. O método de análise sensorial utilizado será o descritivo, o qual caracteriza e descreve as propriedades sensoriais de um produto e consiste em identificar/caracterizar percepções sensoriais da amostra, sendo vários critérios descritivos avaliados para definir o perfil sensorial das bebidas. Além disso, será aplicado o teste de aceitação, o qual avalia através de questionários o quanto o consumidor

Endereço: Av. Madre Benvenutta, 2007
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-8084 **E-mail:** cep.udesc@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.859.714

gosta ou desgosta de determinado produto."

Critério de Inclusão: Os participantes selecionados para a realização da etapa de análise sensorial serão pesquisadores da área de fruticultura e enólogos das instituições que fazem parte da pesquisa, ou seja, UDESC/CAV. Esses grupos já estão habituados a esse tipo de evento, pois são treinados para realizarem frequentemente as degustações, através da participação em cursos e treinamentos realizados nas próprias instituições das quais fazem parte. O principal critério de inclusão será o bem-estar do degustador no dia do evento. Uma observação importante: todos os participantes deverão ser maiores de 18 anos e apresentarem bom estado de saúde, assim como terem dormido bem. Será enviado por e-mail, uma semana antes do evento, uma lista de recomendações a serem seguidas no dia da análise sensorial, constando a preparação: boa alimentação na noite anterior e na manhã do dia do evento, noite bem dormida, não consumir café, não fumar, não fazer uso de perfumes ou cremes e não escovar os dentes próximo ao horário da degustação e programar a logística para participar da análise de forma a não conduzir veículos após as avaliações sensoriais. Além disso, será enviado um questionário para identificar se os participantes possuem doenças celíacas e alergias e/ou intolerância ao álcool e para que possam participar da análise sensorial, a resposta para esses problemas deverá ser negativa.

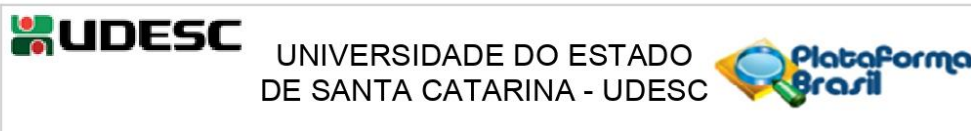
Critério de Exclusão: Menores de 18 anos. Pessoas que possuam doenças celíacas, alergia e/ou intolerância ao álcool não poderão participar da análise sensorial. Caso algum degustador apresente qualquer indisposição, seja constipação, resfriado, gripe, rinite, sinusite ou de qualquer espécie que comprometa seu aparato olfativo-gustativo não poderá participar. E se, por algum motivo o participante não se sentir seguro ou quiser desistir, terá total liberdade para tomar essa decisão, sem nenhum tipo de ônus, seja antecipadamente ou mesmo na hora do início do evento ou em qualquer outro momento durante o desenvolvimento da atividade.

Orçamento, fonte dos recursos, discriminação detalhada: orçamento no total de R\$ 12.971,50, com financiamento próprio.

Cronograma: Análise Sensorial de 29/11/2021 a 22/12/2021. Término do projeto: 07/02/2022.

Não haverá uso de fontes secundárias de dados. Não é um Estudo é Multicêntrico. Não propõe dispensa do TCLE. Não haverá retenção de amostras para armazenamento em banco.

Endereço: Av. Madre Benvenutta, 2007
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-8084 **E-mail:** cep.udesc@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.859.714

Objetivo da Pesquisa:

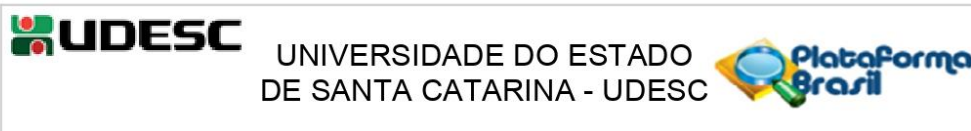
Objetivo Primário: Gerar informações técnicas dentro dos diferentes subprojetos para agregar valor aos produtos agrícolas da Serra Catarinense através da elaboração de bebidas fermentadas a partir de maçãs, uvas e lúpulo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Considerando a ingestão de bebidas alcoólicas, os riscos relacionados a análise sensorial se classificam como médios. Os grupos possuem treinamentos e são capacitados para degustações com bebidas alcoólicas e realizam esse tipo de evento frequentemente. Mas ainda assim, há possíveis riscos para pessoas celíacas, ou seja, aquelas que não podem ingerir glúten. Portanto, o malte utilizado para produção das cervejas pode ocasionar dores abdominais, náuseas, constipação, diarreia, alergias, etc., nos indivíduos que fizerem a ingestão de cervejas. Além disso, há algumas pessoas que podem ter alergia/intolerância ao álcool. Entretanto, os participantes serão informados sobre o procedimento adequado para a degustação das amostras e será informado novamente no dia da degustação (além do e-mail enviado anteriormente) que pessoas celíacas ou com qualquer tipo de intolerância a bebidas alcoólicas não poderão participar da degustação. A orientação é que a amostra não seja ingerida, somente colocada em boca, feito gargarejo e descartada em recipiente adequado para tal. Mas, caso ocorra algum sintoma de mal estar, o participante terá atendimento imediato por profissional técnico, sendo levado prontamente à Enfermaria da instituição para primeira avaliação e, caso seja necessário, para o Pronto Atendimento mais próximo. A equipe de degustadores fará a degustação na UDESC na sala de análise sensorial.

Benefícios: A pesquisa gera benefícios diretos ao degustador, que estará aprimorando os seus conhecimentos em técnicas de análise sensorial. Além disso, a pesquisa possui benefícios indiretos ao degustador, que estará contribuindo para o desenvolvimento das culturas que são fontes de matéria prima para a produção das bebidas fermentadas. A região da Serra Catarinense tem se mostrado promissora no cultivo de uvas finas, maçãs e mais recente no cultivo de lúpulo. O avanço das pesquisas agrega alto desempenho no campo, aumentando a produtividade e a qualidade da matéria-prima e de seus derivados. O potencial destas culturas é o caminho para o desenvolvimento econômico da região. Diante do exposto mostra-se necessário cada vez mais pesquisas para melhorar e encontrar alternativas para o manejo e para aumentar a qualidade destas importantes culturas. O projeto de agregação de valor de produtos agrícolas através de bebidas fermentadas na Serra Catarinense permitirá encontrar alternativas mais

Endereço: Av. Madre Benvenutta, 2007
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-8084 **E-mail:** cep.udesc@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.859.714

adequados ao cultivo da videira, macieira e do lúpulo nessa região, sendo que, a qualidade encontrada no campo será encontrada também nas bebidas fermentadas garantindo o desenvolvimento e o aprimoramento destas atividades na Serra Catarinense.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está estruturado e embasado para a análise ética.

Os objetivos são passíveis de desenvolvimento para pesquisa científica.

Os riscos são caracterizados como médios. Estão descritos os riscos da pesquisa aos participantes. Descreve todos os possíveis riscos associados aos procedimentos da pesquisa. Apresenta as formas de controle e minimização dos riscos, assim como o seguimento, caso ocorram.

Os benefícios são diretos e indiretos aos participantes, e informa corretamente isso no projeto básico e demais documentos.

Os benefícios indicados superam os riscos, estando descritos de forma adequada aos participantes.

Os critérios de inclusão e exclusão estão claramente apresentados.

O número de participantes está correto em todos os documentos.

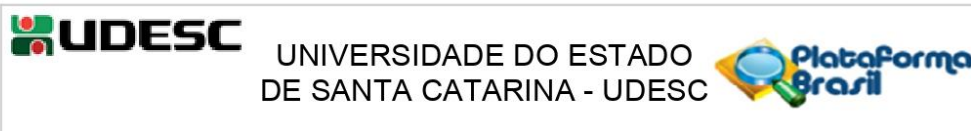
Existe viabilidade do orçamento e cronograma apresentados e as informações são iguais em todos os documentos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentou/anexou:

- 1) Projeto Básico: todos os campos preenchidos e adequados para a apreciação.
- 2) Projeto Detalhado: todos os campos preenchidos e adequados para a apreciação.
- 3) Folha de Rosto: consta o número correto de participantes e está devidamente assinada;
- 4) TCLE: está no modelo CEP/UDESC;
- 5) Instrumentos de coletas de dados: fichas/questionários de avaliação (degustação, análise sensorial, análise de aceitação, etc)

Endereço: Av. Madre Benvenutta, 2007
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-8084 **E-mail:** cep.udesc@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.859.714

6) Carta Resposta ao CEP.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Visto que todas as pendências da versão anterior foram atendidas, conforme carta resposta ao CEP anexada ao presente protocolo;

Considerando que não há pendências na presente versão;

E que não foram observados óbices éticos, conclui-se protocolo de pesquisa APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

A Diretoria APROVA o Protocolo de Pesquisa e informa que, qualquer alteração necessária ao planejamento e desenvolvimento do Protocolo Aprovado ou cronograma final, seja comunicada ao CEP via Plataforma Brasil na forma de EMENDA, para análise sendo que para a execução deverá ser aguardada aprovação final do CEP. A ocorrência de situações adversas durante a execução da pesquisa deverá ser comunicada imediatamente ao CEP via Plataforma Brasil, na forma de NOTIFICAÇÃO. Em não havendo alterações ao Protocolo Aprovado e/ou situações adversas durante a execução, deverá ser encaminhado RELATÓRIO FINAL ao CEP via Plataforma Brasil até 60 dias da data final definida no cronograma, para análise e aprovação. Lembramos ainda, que o participante da pesquisa ou seu representante legal, quando for o caso, bem como o pesquisador responsável, deverão rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo suas assinaturas na última página do referido Termo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1647677.pdf	16/06/2021 09:25:40		Aceito
Outros	CARTARESPOSTA.pdf	16/06/2021 09:21:55	LEO RUFATO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TermoCLE.pdf	16/06/2021 09:06:11	LEO RUFATO	Aceito

Endereço: Av. Madre Benvenutta, 2007
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-8084 **E-mail:** cep.udesc@gmail.com



Continuação do Parecer: 4.859.714

Justificativa de Ausência	TermoCLE.pdf	16/06/2021 09:06:11	LEO RUFATO	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	10/06/2021 08:39:06	LEO RUFATO	Aceito
Outros	fichavinho.pdf	01/06/2021 15:49:32	LEO RUFATO	Aceito
Outros	FichaCerveja.pdf	01/06/2021 15:44:21	LEO RUFATO	Aceito
Outros	FichaSidra.pdf	01/06/2021 15:34:30	LEO RUFATO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_bebidas.doc	22/04/2021 09:26:36	LEO RUFATO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 21 de Julho de 2021

Assinado por:
Gesilani Júlia da Silva Honório
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Madre Benvenutta, 2007
Bairro: Itacorubi **CEP:** 88.035-001
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3664-8084 **Fax:** (48)3664-8084 **E-mail:** cep.udesc@gmail.com

ANEXO B – Ficha de degustação utilizada para análise sensorial das cervejas.
Lages, UDESC, 2022.

Ficha de Avaliação Descritiva – Cervejas			
Nome: _____		Data: _____	
<p>Você está recebendo três amostras codificadas. Indique o quão ideal está cada amostra em relação a cada característica solicitada utilizando a escala abaixo.</p> <p>(1) muito baixo (2) baixo (3) médio (4) forte (5) muito forte</p>			
APARÊNCIA			
Cor:	() 115	() 227	() 320
Turbidez:	() 115	() 227	() 320
Espuma:			
Consistência:	() 115	() 227	() 320
Estabilidade:	() 115	() 227	() 320
Carbonatação:	() 115	() 227	() 320
PERCEPÇÃO SENSORIAL			
Álcool:	() 115	() 227	() 320
Malte:	() 115	() 227	() 320
Doce:	() 115	() 227	() 320
Acidez:	() 115	() 227	() 320
Amargor:	() 115	() 227	() 320
Oxidação:	() 115	() 227	() 320
Corpo:	() 115	() 227	() 320
AROMA			
Avalie a amostra de cerveja e assinale todas as opções que você considera apropriada para descrevê-la.			
Frutado	() 115	() 227	() 320
Adocicado	() 115	() 227	() 320
Fermentado	() 115	() 227	() 320
Alcoólico	() 115	() 227	() 320
Cítrico	() 115	() 227	() 320
Caramelo	() 115	() 227	() 320
Lupulado	() 115	() 227	() 320
Torrado	() 115	() 227	() 320
Floral	() 115	() 227	() 320
Frutas Cristalizadas	() 115	() 227	() 320
Herbáceo	() 115	() 227	() 320
Solvente	() 115	() 227	() 320
Café	() 115	() 227	() 320
Malte	() 115	() 227	() 320
Amargo	() 115	() 227	() 320
Amadeirado	() 115	() 227	() 320
Refrescante	() 115	() 227	() 320
Cite caso tenha identificado algum aroma que não esteja presente na lista acima:			