

**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

Helder Rainha e Silva

**Estudo do efeito de novas técnicas de  
lupulização no tempo de prateleira da  
cerveja artesanal**

Dissertação de Mestrado  
Mestrado Integrado em Engenharia Biológica  
Ramo de Tecnologia Química e Alimentar

Trabalho efetuado sob a orientação da  
**Doutora Lucília Domingues**  
e do  
**Engenheiro Filipe Macieira**

outubro de 2015

## DECLARAÇÃO

Nome: Helder Rainha e Silva

Título da dissertação: Estudo do efeito de novas técnicas de lupulização no tempo de prateleira da cerveja artesanal

Orientador(es): Doutora Lucília Domingues, Engenheiro Francisco Pereira e Engenheiro Filipe Macieira

Ano de conclusão: 2015

Designação do Mestrado: Mestrado Integrado em Engenharia Biológica – Ramo Tecnologia Química e Alimentar

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA DISSERTAÇÃO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

(Helder Rainha e Silva)

## Agradecimentos

No decorrer deste trajecto, desenvolvi uma série de competências a nível profissional e social, que foram fulcrais para a concretização deste trabalho. A conclusão deste percurso não teria sido possível sem o apoio de algumas pessoas que fizeram parte desta longa viagem.

À minha orientadora, a Professora Doutora Lucília Domingues, obrigado pelo apoio e disponibilidade durante a realização deste trabalho. Acima de tudo, agradeço pela compreensão que, mesmo em momentos difíceis que posso ter passado nos últimos tempos, a professora me ajudou a não desanimar e a não deitar tudo a perder.

Aos meus Co-orientadores da empresa FermentUM Doutor Francisco Pereira e Engenheiro Filipe Macieira, obrigado pela oportunidade de realizar este trabalho aliciante, assim como a orientação e instrução no âmbito do estágio curricular. Sinto que, apesar de ainda ser inexperiente a nível profissional, a vossa disponibilidade em me acolher ajudou-me bastante a poder entrar no mercado de trabalho, não só de uma maneira mais fácil, mas essencialmente com uma visão mais alargada das minhas competências profissionais.

Ao Engenheiro Eduardo Coelho, agradeço toda a ajuda e lições de vida tanto pessoais como profissionais dadas ao longo deste projeto. Sem o seu apoio na resolução dos obstáculos criados durante o projeto nada disto seria possível.

Ao Engenheiro António Sousa, obrigado pelo apoio, ensinamentos e acima de tudo, por me demonstrar que “quem ri por último, ri melhor”.

Aos meus pais e à minha irmã, por se disponibilizarem sempre a ajudar em todos os momentos possíveis da minha vida.

Aos meus amigos da minha querida cidade da Póvoa de Varzim, obrigado por toda a paciência para a minha falta de disponibilidade nos últimos tempos, mas acima de tudo, vos agradeço pela nossa forte amizade que nos une há vários anos.

Aos amigos que fiz durante os meus tempos em Coimbra, agradeço por me ajudarem a crescer como pessoa, fazendo-me perceber que “nada é impossível” e que “basta acreditar”.

Aos amigos que vieram comigo de Coimbra para Braga, obrigado pela ajuda, compreensão e companheirismo.

Aos amigos que fiz em Braga, obrigado por vos ter conhecido e por todo o apoio dado ao longo destes últimos três anos.

## Resumo

Uma vez que as cervejas produzidas pelo método artesanal não são pasteurizadas nem filtradas, deterioram-se mais rapidamente. Um possível método para aumento do tempo de prateleira da cerveja artesanal é o uso de estratégias com base na adição de lúpulo em diferentes tempos e fases do processo de produção de cerveja. Este projeto tem como principal objetivo o estudo dos efeitos da lupulização na estabilidade de uma receita de cerveja artesanal.

Inicialmente efetuaram-se ensaios com lúpulo e água (extrações aquosas), utilizando tempos e temperaturas referentes a várias técnicas de lupulização, para uma posterior análise química e sensorial destas. Consoante as avaliações selecionou-se três técnicas de lupulização para utilizar na produção de 3 cervejas a partir de uma receita de cerveja artesanal do tipo *Pilsner*, que foram: *whirlpool hopping* (Whirlpool), *hop back* (Recirculação Quente) e *Boil* (final da ebulição do mosto). Além das cervejas produzidas também se guardou a cerveja de controlo para ter uma função comparativa em relação às restantes. Por fim avaliou-se vários parâmetros para estas cervejas. Os parâmetros que foram analisados de 5 vezes ao longo do tempo de armazenamento foram o pH, o °Brix, a condutividade eléctrica e a estabilidade da espuma. Além destes, também foram analisados os IBUs, a atividade antioxidante (FRAP), concentração do etanol (por HPLC) e linalol (indicador do aroma lupulado na cerveja) e  $\alpha$ -terpeniol (por GC-MS) no tempo inicial e final da monitorização.

A cerveja de Controlo foi a que obteve melhores resultados na generalidade das análises realizadas ao longo do tempo de armazenamento. Das 3 técnicas de lupulização utilizadas na produção das cervejas, a que mostrou ter melhor influência ao longo do tempo de prateleira da cerveja foi a adição de lúpulo no final da etapa de ebulição do mosto, referente à cerveja *Boil*.

## PALAVRAS-CHAVE

Técnicas de lupulização, estabilidade da cerveja, perfil sensorial, linalol

## Abstract

Once the beers produced by craft method are not pasteurized or filtered, they deteriorate more rapidly. One possible method for increasing the shelf time is the use of strategies based on hop addition times and at different stages of the brewing process. This project aims to study the effects of hops in the stability of a craft beer recipe.

Initially tests were carried out with hops and water (aqueous extraction), using times and temperatures regarding various hopping techniques for further chemical and sensory analysis. Depending on the ratings three hopping techniques were selected for use in the production of three pilsner type beer recipe, which were whirlpool hopping (Whirlpool), hop back (hot recirculation) and Boil (final boiling must). In addition to the beers produced the control beer was also kept for comparison with the others. Finally we evaluated various parameters for these beers. The parameters that were analyzed five times during the storage period were pH, °Brix, the electrical conductivity and the stability of the foam. In addition, the IBUs, the antioxidant activity (FRAP), the ethanol concentration (HPLC) and linalool (scent indicator hopped in beer) and  $\alpha$ -terpineol (GC-MS) were also analyzed at baseline and final monitoring.

Control beer was the one that obtained the best results in most of the analyzes carried out during the storage time. Of the 3 hopping techniques used in the production of beer, the addition of hops at the end of the wort boiling step, referring to Boil beer, was the one found to have better influence over the shelf time.

## KEYWORDS

Hopping techniques, beer stability, sensory profile, linalool



## Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ATP	adenosina tri-fosfato
$C_{10}H_{5}OH$	etanol
$C_6H_{12}O_6$	glucose
$CH_3COOH$	ácido acético
$CH_3COONa$	acetato de sódio
$CO_2$	dióxido de carbono
DMS	dimetilsulfido
DMSO	dimetilsulfóxido
EBC	Convenção Europeia de Cervejeiros
FA	analisador de espuma
$FeCl_3$	cloreto de ferro
$FeSO_4$	sulfato de ferro
FRAP	poder antioxidante da redução do ferro
GC-MS	cromatografia gasosa-espectrometria de massa
HCl	ácido clorídrico
HPLC	cromatografia líquida de elevada pressão (eficiência)
IBU	unidade internacional de amargor
$O_2$	oxigénio
rpm	rotações por minuto
SMN	S-metilmetionina
tf	tempo final
ti	tempo inicial
TPTZ	2,4,6-tris (1-piridil)-5-triazina
UV	radiação ultra-violeta
V	volume
VKD	dicetona vicinal





# Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos .....	vii
Índice.....	ix
Índice de Figuras .....	xiii
Índice de Tabelas .....	xv
1 Introdução .....	1
1.1 Contextualização.....	1
1.2 Objetivo Geral .....	2
1.2.1 Objetivos Específicos .....	2
1.3 Apresentação da empresa.....	3
2 Revisão Bibliográfica .....	5
2.1 Processo de produção.....	5
2.1.1 Maltagem .....	5
2.1.2 Moagem.....	5
2.1.3 Brassagem .....	5
2.1.4 Filtração do mosto.....	5
2.1.5 Ebulição do mosto .....	6
2.1.6 Centrifugação ( <i>Whirlpool</i> ).....	6
2.1.7 Arrefecimento .....	6
2.1.8 Arejamento.....	6
2.1.9 Fermentação primária .....	6
2.1.10 Maturação ou fermentação secundária .....	7
2.1.11 Engarrafamento, encapsulação e rotulagem.....	8
2.2 Água.....	8
2.3 Levedura .....	8
2.4 Lúpulo.....	9
2.4.1 Planta.....	9

2.4.2	Colheita.....	12
2.4.3	Variedades de lúpulo .....	13
2.4.4	Novas variedades de lúpulo .....	14
2.4.5	Lúpulo <i>Super High-alpha</i> .....	15
2.4.6	Química do lúpulo.....	15
2.4.6.1	Polifenóis .....	15
2.4.6.2	<i>Xanthohumol</i> .....	16
2.4.6.3	Reação de isomerização .....	16
2.4.6.4	Espuma e sabor amargo .....	17
2.4.6.5	Importância da taxa de <i>cohumulone</i> na estabilização da espuma .....	17
2.4.6.6	Óleos Essenciais do Lúpulo – Álcoois Monoterpênicos .....	17
2.4.7	Análise do lúpulo .....	19
2.4.7.1	Avaliação física, visual e olfativa do lúpulo.....	19
2.4.8	Técnicas de lupulização .....	19
2.4.8.1	Técnica Tradicional .....	20
2.4.8.2	<i>Mash Hopping</i> .....	21
2.4.8.3	<i>First Wort Hopping</i> .....	21
2.4.8.4	Final da ebulição ( <i>late hopping</i> ) .....	21
2.4.8.5	<i>Whirlpool Hopping (late hopping)</i> .....	22
2.4.8.6	<i>Hop Back (late hopping)</i> .....	22
2.4.8.7	<i>Dry Hopping</i> .....	22
2.5	Fatores que influenciam o tempo de prateleira da cerveja.....	23
3	Materiais e Métodos.....	25
3.1	Materiais .....	25
3.1.1	Avaliação das diferentes técnicas de lupulização nas extrações aquosas .....	25
3.1.2	Produção das cervejas recorrendo às técnicas de lupulização escolhidas.....	27
3.1.3	Avaliação da estabilidade da cerveja ao longo do tempo de prateleira .....	28
3.2	Monitorização das cervejas durante o tempo de prateleira .....	29
3.2.1	Análise da Estabilidade da Espuma .....	29

3.2.2	Conductividade Elétrica .....	30
3.2.3	Medição do pH .....	30
3.2.4	Análise do °Brix.....	31
3.3	Monitorização da cerveja no início e no fim do experimento (Ti e Tf) .....	31
3.3.1	HPLC ( <i>High Performance Liquid Chromatography</i> ) .....	31
3.3.2	Extração dos compostos voláteis.....	32
3.3.3	GC-MS ( <i>Gas Chromatography – Mass Spectrography</i> ).....	32
3.3.4	IBUs ( <i>International Bitterness Units</i> ).....	32
3.3.5	FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	33
3.3.6	Análise Sensorial .....	34
<b>4</b>	<b>Discussão dos resultados.....</b>	<b>37</b>
4.1	Extrações Aquosas.....	37
4.1.1	Análise sensorial das extrações aquosas .....	37
4.1.2	FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	38
4.1.3	IBU.....	39
4.1.4	Análise de compostos voláteis.....	40
4.1.5	Escolha das 3 técnicas de lupulização na produção das cervejas.....	42
4.2	Análise do °Brix durante a produção das cervejas .....	42
4.3	Monitorização das cervejas ao longo do tempo de prateleira .....	43
4.3.1	°Brix .....	43
4.3.2	pH.....	44
4.3.3	Estabilidade da Espuma.....	45
4.3.4	Conductividade Elétrica .....	47
4.3.5	FRAP ( <i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i> ) .....	47
4.3.6	IBUs (Amargor).....	48
4.3.7	Análise do etanol ao longo do tempo de prateleira.....	50
4.3.8	Análise de compostos voláteis.....	52
4.3.9	Análise Sensorial .....	53
4.3.9.1	Aparência.....	53
4.3.9.2	Aroma (odor).....	55

4.3.9.3	Sabor .....	56
4.3.9.4	Sensação ( <i>mouthfeel</i> ).....	58
4.3.9.5	Qualidade geral .....	59
4.3.9.6	Qualidade Global .....	60
5	Conclusões e sugestões de trabalho futuro.....	61
	Referências Bibliográficas .....	64

## Índice de Figuras

Figura 1	Processo de produção da cerveja artesanal. Retirado de (“www.cervejaetra.pt”).....	2
Figura 2	Plantação de lúpulo. Retirado de ( <a href="http://tierradecerveza.com/blog/el-misterioso-lupulo/">http://tierradecerveza.com/blog/el-misterioso-lupulo/</a> )...	10
Figura 3	Lúpulo em forma de pellets. Retirado de (“www.academiacervecera.com”).....	10
Figura 4	Cone de lúpulo cortado a meio, em que (A) representa a lupulina e (B) representa bráctea. Adaptado de (“www.academiacervecera.com”).....	11
Figura 5	Ilustração dos perfis de aromas de 2 variedades distintas o lúpulo <i>Saazer</i> e <i>Cascade</i> . Adaptado de (Inui T. <i>et al.</i> , 2013).....	13
Figura 6	Biotransformação dos álcoois monoterpênicos, por ação do metabolismo das leveduras. Adaptado de (Takoi K. <i>et al.</i> , 2010). ....	18
Figura 7	Relevância do aroma e amargor na cerveja, consoante o tempo de adição do lúpulo na etapa de ebulição do mosto. ....	20
Figura 8	Técnica de lupulização usando um sistema de recirculação ( <i>Hop Back</i> ), adaptado (“www.maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt,” 2014).....	22
Figura 9	Adição de lúpulo à cuba de fermentação/maturação recorrendo à pressão por dióxido de carbono, adaptado de (“www.maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt,” 2014).....	23
Figura 10	Instalação ( <i>Setup</i> ) da técnica de recirculação (tanto a frio ou a quente) com as extrações aquosas. ....	26
Figura 11	Cubas de produção de cerveja. ....	27
Figura 12	Equipamento <i>Foam-Analiser</i> .....	29
Figura 13	Aparelho PHD-1 da marca PCE. ....	30
Figura 14	Medidor de pH.....	30
Figura 15	Refratômetro digital MA871 da Milwaukee.....	31
Figura 16	Placa de Elisa de 96 poços. ....	33
Figura 17	Avaliação das extrações aquosas ao nível de amargor e aroma. ....	37
Figura 18	Análise do poder antioxidante das extrações aquosas. ....	38
Figura 19	Avaliação dos IBUs das extrações aquosas. ....	39
Figura 20	Concentração do linalol e do $\alpha$ -terpeniol nas extrações aquosas. ....	41
Figura 21	Avaliação do $^{\circ}$ Brix durante o tempo de fermentação. ....	42
Figura 22	Análise do Brix ao longo do tempo de prateleira das cervejas.....	43
Figura 23	Dados do pH ao longo do tempo de prateleira das cervejas. ....	45

Figura 24	Avaliação da estabilidade da espuma ao longo do tempo de prateleira das cervejas. ....	46
Figura 25	Análise da condutividade elétrica ao longo do tempo de prateleira das cervejas. ....	47
Figura 26	Análise do poder antioxidante das cervejas em ti e tf. ....	48
Figura 27	Avaliação de amargor nas cervejas em ti e tf. ....	49
Figura 28	Teor alcoólico volumétrico das cervejas em ti e tf. ....	51
Figura 29	Concentração do linalol e do $\alpha$ -terpineol nas cervejas em ti e tf. ....	52
Figura 30	Gráficos sensoriais relativos à aparência de cada cerveja em ti e tf. ....	54
Figura 31	Gráficos sensoriais relativos ao aroma de cada cerveja em ti e tf. ....	55
Figura 32	Gráficos sensoriais relativos ao sabor de cada cerveja em ti e tf. ....	57
Figura 33	Gráficos sensoriais relativos à sensação de cada cerveja em ti e tf. ....	58
Figura 34	Gráficos sensoriais relativos às qualidades gerais de cada cerveja em ti e tf. ....	59
Figura 35	Qualidade global das cervejas em ti e tf. ....	60
Figura A 1	Esquema com os diferentes compostos presentes nas resinas do lúpulo. Adaptado de (Almaguer <i>et al.</i> , 2014). ....	70
Figura A 2	Esquema dos diferentes polifenóis presentes no lúpulo. Adaptado de (Almaguer <i>et al.</i> , 2014). ....	70
Figura A 3	Curva de calibração das soluções padrão. ....	71
Figura A 4	Curva de calibração das soluções padrão do relativas ao FRAP em tf. ....	75
Figura A 5	Curva de calibração do etanol em Ti. ....	77

## Índice de Tabelas

Tabela 1	Representação das características de cada letra, referente a cada cerveja. Retirado de (“www.cervejalettra.pt”).....	3
Tabela 2	Composição química global dos cones de lúpulo secos. Adaptado de (Almaguer C. <i>et al</i> , 2014) .....	11
Tabela 3	Doenças e pestes que mais ocorrem no lúpulo. Adaptada de (Priest F. <i>and</i> Stewart G., 2006) .....	12
Tabela 4	Características de alguns tipos de lúpulo diferentes. Adaptado de (“www.barthhaasgroup.com”) .....	14
Tabela 5	Nome das técnicas de lupulização utilizadas nas extrações aquosas e respetivas temperaturas da adição do lúpulo.....	26
Tabela 6	Tipos de lúpulos, técnicas de lupulização e respetivas concentrações de lúpulo, na produção da cerveja de controlo .....	28
Tabela A 1	Dados do FRAP das extrações aquosas.....	71
Tabela A 2	Dados da análise de IBUs relativa às extrações aquosas .....	72
Tabela A 3	Dados analisados por GC-MS do linalol, 4-nonanol e $\alpha$ -terpineol, relativos às extrações aquosas .....	73
Tabela A 4	Valores do Brix nas cervejas ao longo do tempo de prateleira .....	74
Tabela A 5	Dados do pH nas cervejas ao longo do tempo de armazenamento .....	74
Tabela A 6	Dados da velocidade de degradação da espuma nas cervejas ao longo do tempo de prateleira .....	74
Tabela A 7	Valores da condutividade elétrica das cervejas ao longo do tempo de prateleira.....	75
Tabela A 8	Dados do método FRAP relativos às cervejas em $t_i$ e $t_f$ .....	76
Tabela A 9	Dados da avaliação de IBUs de todas as cervejas em $t_i$ e $t_f$ .....	76
Tabela A 10	Dados referentes ao etanol nas cervejas em $t_i$ e $t_f$ .....	78
Tabela A 11	Dados do linalol, 4-nonanol e $\alpha$ -terpineol nas cervejas em $t_i$ e $t_f$ .....	78





# 1 Introdução

## 1.1 Contextualização

Atualmente a cerveja é a bebida alcoólica mais bebida no Mundo e pode-se afirmar que nela existem mais de 800 compostos responsáveis pelo seu sabor. Existem vários estilos de cerveja, que se diferem entre si devido à junção de fatores utilizados: ingredientes, e processos de fabrico dando origem a diferentes receitas de cerveja artesanal que são apresentados no mercado com diferentes estratégias de marketing e comunicação (Barth R., 2013; Jaskula-Goiris B. *et al*, 2010; Priest F. *and* Stewart G., 2006).

Os ingredientes essenciais na produção de cerveja são: água, malte de cereal (como cereais maltados, que contêm açúcares), os lúpulos e as leveduras, apesar de alguns cervejeiros além destes ingredientes utilizarem também alguns auxiliares de processamento, como xaropes, açúcares ou outro tipo de cereais. No caso da cerveja artesanal, numa perspetiva geral, os auxiliares de processamento são evitados usando-se apenas os 4 ingredientes essenciais (Lewis M. & Young T., 2002; Priest F. *and* Stewart G., 2006).

Este projeto tem como principal objetivo estudar o efeito das técnicas de lupulização na estabilidade de uma receita de cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira. Técnicas de lupulização (*hopping techniques*) são técnicas de adição de lúpulo à cerveja, em diferentes etapas do processo cervejeiro, fazendo com que o lúpulo esteja em contacto com o mosto a temperaturas e tempos diferentes.

O lúpulo tem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sendo por isso considerado um conservante natural da cerveja. Visto que na produção de cerveja artesanal não se utilizam aditivos, o lúpulo vai ter um papel fundamental na conservação da mesma e como tal, vai ter influência no tempo de prateleira (EBlinger H., 2009).

Uma vez que as cervejas produzidas pelo método artesanal não são pasteurizadas nem filtradas, deterioram-se mais rapidamente, levando a um menor tempo de prateleira que a industrial. O único processo biológico de estabilização do produto final é a decantação no final da fermentação, para remover as leveduras e outros resíduos existentes do lúpulo para depois se proceder ao embalamento em garrafa ou em barril.

A Figura 1 mostra resumidamente o processo de produção de uma cerveja produzida pelo método artesanal.

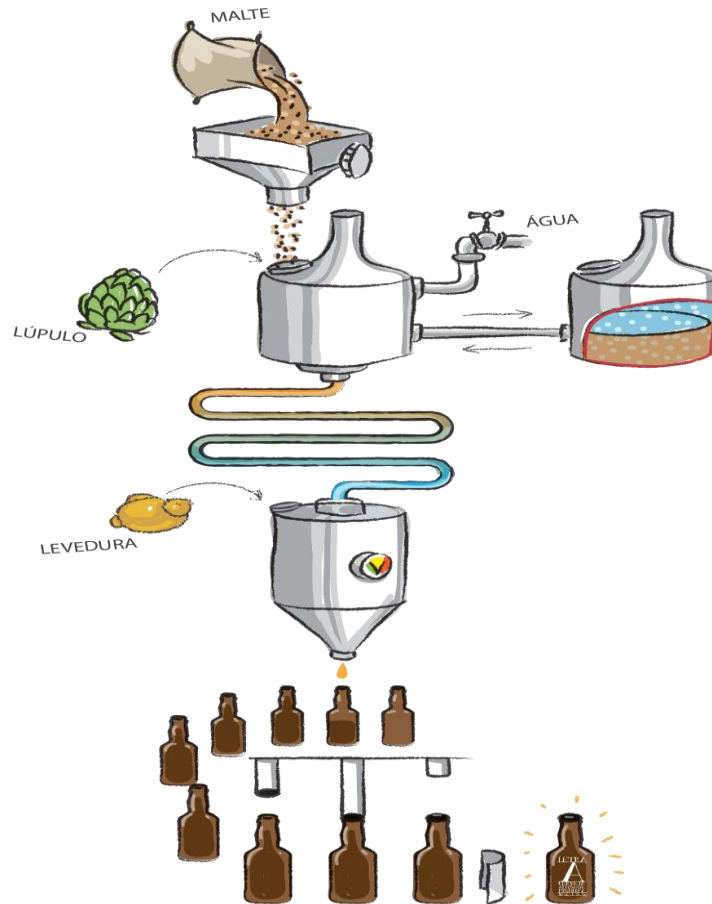


Figura 1 Processo de produção da cerveja artesanal. Retirado de ("www.cervejaetra.pt").

## 1.2 Objetivo Geral

Este projeto tem como principal objetivo o estudo dos efeitos do lúpulo na estabilidade de uma receita de cerveja artesanal. Desta forma vão ser realizados diversos ensaios de modo a avaliar a estabilidade química e sensorial da cerveja artesanal ao longo do tempo de prateleira.

### 1.2.1 Objetivos Específicos

O primeiro objetivo específico passou pela avaliação de alguns parâmetros em extrações aquosas (água e lúpulo), para a escolha de 3 técnicas de lupulização a utilizar numa receita de cerveja artesanal.

No final da produção de 3 cervejas utilizando as diferentes técnicas de lupulização, avaliou-se vários parâmetros ao longo do tempo de prateleira, com o intuito de observar a estabilidade da cerveja neste tempo.

### 1.3 Apresentação da empresa

O projeto da empresa FERMENTUM – Engenharia das Fermentações, Lda foi desenvolvido entre 2009 e 2011 tendo sido implementadas as instalações de produção em 2013 em Vila Verde (Braga) pelos Engenheiros Filipe Macieira e Francisco Pereira. A empresa é atualmente uma *spin-off* da Universidade do Minho, com uma forte colaboração com o Centro de Engenharia Biológica, participando ativamente em projetos de I&DT focados no controlo de qualidade da cerveja artesanal e desenvolvimento de novas metodologias para avaliação sensorial e química das suas receitas.

Atualmente, a empresa apresenta-se no mercado com a marca “LETRA- Cerveja Artesanal Minhota”. Distingue-se das cervejas industriais pois é feita a partir de métodos de fabrico artesanais utilizando-se no processo de fabrico ingredientes 100 % naturais, como água, cereais, lúpulo e levedura. Estas cervejas são mais turvas, mais aromáticas e mais intensas. Contendo características organoléticas distintas da cerveja produzida industrialmente, pois não sofre filtração e pasteurização após a fermentação.

Atualmente a cerveja artesanal Letra tem quatro tipos de cerveja base no mercado: Letra A (*Weiss*), Letra B (*Pilsner*), Letra C (*Stout*) e Letra D (*Red Ale*). Além destas cervejas, também estão disponíveis no mercado mais dois tipos de cerveja – Edições limitadas - Letra E (*Belgian Dark Strong Ale*) e a Letra F (*India Pale Ale*). As características dos tipos de cerveja referidos estão apresentadas na Tabela 1, revelando assim as suas distinções.

**Tabela 1** Representação das características de cada letra, referente a cada cerveja. Retirado de (“www.cervejaletra.pt”)

Letra	A	B	C	D	E	F
Estilo	<i>Weiss</i>	<i>Pilsner</i>	<i>Stout</i>	<i>Red Ale</i>	<i>Belgian Dark Strong Ale</i>	<i>Indian Pale Ale</i>
Teor alc. (%v/v)	4.6 %	5.0 %	5.5 %	6.0 %	9 %	6.5 %
Mosto (plato)	11	12	12.5	13	21	14.5
Cor (EBC)	Loira e turva (6.5)	Loira (6.7)	Preta (55)	Ruiva (20)	35	Âmbar (17)
Amargor (IBU)	15	17	25	27	21	38
Maltes	Trigo e Cevada	Cevada	Cevada, Trigo, Chocolate e Torrado	Cevada e Cristal	Cevada, Trigo, Chocolate e Torrado	Cevada, Cristal e <i>Munich</i>
Origem do Lúpulo	Alemanha	Alemanha e R. Checa	Alemanha e E.U.A	Alemanha e R. Checa	Alemanha, R. Checa e E.U.A	Alemanha e E.U.A



## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Processo de produção

#### 2.1.1 Maltagem

Para a produção de cerveja os cereais (uma das matérias-primas do processo cervejeiro), sofrem o processo de maltagem. A maltagem é constituída por 3 etapas, a primeira é a imersão dos grãos de cevada, trigo ou centeio em contacto com a água, de forma a aumentar a sua humidade durante 2 dias, para permitir que se atinja uma humidade acima dos 32 % e seja iniciada a germinação. Durante a germinação ocorre a sintetização de enzimas essenciais para a hidrólise dos amidos, proteínas e das paredes celulares (fragilizando-as), tornando mais fácil a conversão dos açúcares numa fase posterior do processo. A sub-etapa final é designada por secagem onde a germinação e digestão enzimática vão ser interrompidas por ar aquecido, sem que as enzimas responsáveis pela hidrólise do amido (por vezes também as das proteínas e parede celular) sejam destruídas (Bamforth C., 2003).

#### 2.1.2 Moagem

Após a etapa de maltagem, o cereal maltado é moído para expor o conteúdo do endosperma (amido) às enzimas e ocorrer a sua hidrólise a açúcares fermentáveis. Nesta fase os grãos devem ser moídos gentilmente de forma a não fazer farinha. As cascas do cereal vão funcionar na etapa de filtração como bolo filtrante do mosto e desta forma se houver muita farinha ocorre a colmatação do mosto e a filtração torna-se impossível (Lewis M. & Young T., 2002).

#### 2.1.3 Brassagem

Esta etapa é realizada na cuba de brassagem onde os cereais maltados vão ser adicionados a água aquecida (temperatura entre 54 °C a 72 °C), fazendo com que o amido se converta em açúcares fermentáveis através da ação de enzimas. A mistura de malte e água – solução açucarada - é a matéria-prima que contém os nutrientes necessários para a levedura, que vai converter os açúcares existentes no mosto em etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Bamforth C., 2003; Lewis M. & Young T., 2002).

#### 2.1.4 Filtração do mosto

Concluída a brassagem, o mosto sofre uma filtração para remoção das partículas insolúveis. As películas dos grãos de cereais maltados que ficam presos no filtro designam-se por *drêche* (Bamforth C., 2003; Lewis M. & Young T., 2002).

### **2.1.5 Ebulição do mosto**

Depois da filtração o mosto vai ser exposto a temperaturas elevadas (temperatura igual ou superior a 100°C), com o objetivo de esterilizar o mosto para eliminar microrganismos capazes de dificultar a fermentação alcoólica. Usando a técnica de lupulização tradicional, é nesta etapa que se adiciona lúpulo, para os  $\alpha$ -ácidos presentes nas resinas do lúpulo serem extraídos e conseqüentemente sofrerem reações de isomerização originando iso- $\alpha$ -ácidos devido às temperaturas elevadas a que esta etapa se realiza (Bamforth C., 2003; Lewis M. & Young T., 2002).

Nos Capítulos 2.5.6.3 Reação de isomerização e 2.5.8.1 Técnica Tradicional, serão explorados em maior pormenor alguns aspetos importantes sobre a lupulização na etapa de ebulição.

### **2.1.6 Centrifugação (*Whirlpool*)**

A etapa de centrifugação (*Whirlpool*) tem como objetivo clarificar o mosto, onde se verifica a separação do mosto das substâncias turvas (*trub*) e outro tipo de partículas indesejadas para a fermentação alcoólica. O equipamento utilizado para nesta etapa designa-se por *Whirlpool* (Bamforth C., 2003).

### **2.1.7 Arrefecimento**

Seguidamente à clarificação do mosto, este deve arrefecer para permitir a adição de levedura e o arranque da fermentação alcoólica. Industrialmente o arrefecimento do mosto é efetuado através da passagem num permutador de calor tubular ou de placas no sentido de trocar calor com água gelada e assim baixar a temperatura dos 98 °C para cerca de 20 °C. Isto permite que o mosto atinja uma temperatura melhor para a sobrevivência e ação da levedura na fermentação alcoólica, que vai ser efetuada posteriormente na cuba de fermentação (Bamforth C., 2003).

### **2.1.8 Arejamento**

Depois da fase de arrefecimento, é geralmente fornecido oxigénio que é difundido no mosto para que as leveduras que vão ser adicionadas na cuba de fermentação possuam uma atividade regular durante a etapa inicial de fermentação. Assim sendo a concentração de oxigénio requerida é de aproximadamente 9 mg<sub>oxigénio</sub>/L (Barth R., 2013; Priest F. and Stewart G., 2006).

### **2.1.9 Fermentação primária**

Nesta etapa é inoculada a levedura adequada para o mosto em que numa fase inicial ocorre o crescimento da levedura. A fase de crescimento da levedura é realizada sob a presença de oxigénio, designada por respiração sintetizando substâncias orgânicas (como enzimas) para ajudar no

crescimento (tamanho e número de células de levedura aumentam). Entre 6 h e 10 h a maior parte do oxigénio dissolvido é consumido iniciando-se então a fermentação alcoólica. Convém que durante a reação numa cuba de fermentação de elevado volume, as temperaturas sejam controladas, visto que a reação é exotérmica é conveniente baixar a temperatura para favorecer o metabolismo e viabilidade da levedura, e para que não sejam criados sabores ou aromas indesejáveis para a cerveja final (Barth R., 2013; Lewis M. & Young T., 2002; Priest F. and Stewart G., 2006).

A fermentação alta é executada a temperaturas entre 18 °C e 22°C e as leveduras do tipo *ale* são recolhidas no topo do fermentador em caso de tanques abertos. (Bamforth C., 2003).

Durante a fermentação podem-se formar subprodutos pelas vias metabólicas da levedura, responsáveis pelo sabor e aroma da cerveja. Entre os subprodutos formados distinguem-se compostos como os álcoois multivalentes, álcoois superiores aromáticos e alifáticos, ácidos orgânicos, compostos de carbonilo e compostos que contêm enxofre. Assim sendo, o conjunto destes compostos podem influenciar o bom ou mau sabor/aroma (*flavor* ou *off-flavor*) da cerveja (Priest F. and Stewart G., 2006).

A fermentação pode ser monitorizada pelos cervejeiros pela análise de alguns parâmetros, como a análise do pH e a medição do °Brix. A análise do pH é um indicador de controlo da fermentação. O pH da cerveja deverá estar compreendido entre valores de 4.3 e 4.6, de forma a evitar o crescimento bactérias patogénicas na cerveja. O pH decresce aproximadamente uma unidade durante a fermentação da cerveja, pela formação e secreção de alguns ácidos orgânicos voláteis e não-voláteis por parte da levedura como: o ácido acético, o ácido cítrico, o ácido málico, o ácido láctico, entre outros. A velocidade de formação destes ácidos depende de quatro factores: o tipo de método de fermentação usado, o tipo e estirpe de levedura, a capacidade de tamponamento do mosto (*buffering*) e a quantidade existente de azoto assimilável presente no mosto (Bamforth C., 2003; Esslinger H. & Narziss L., 2005; Priest F. and Stewart G., 2006).

Em geral, a análise do °Brix (*refractive index*) mede o teor de sólidos solúveis (como açúcares, pectinas, aminoácidos, ácidos orgânicos, entre outros) de uma solução aquosa, utilizando um refratómetro. No caso da cerveja o °Brix permite uma aproximação ao teor de açúcares, pelo que estas análises permitem a monitorização do processo fermentativo (Bumgarner M. and Natalie R., 2012; Mignani *et al.*, 2013).

#### **2.1.10 Maturação ou fermentação secundária**

Depois da fermentação primária, retira-se grande parte levedura que floculou na base cónica da cuba de fermentação, deixando ainda algumas leveduras em contacto com a cerveja para baixar o teor de alguns compostos de aromas ou sabores indesejáveis para a cerveja final, como o diacetilo e o

2,3-pentadoniona (VDKs - *vicinal diketones*). Esta etapa designa-se por fermentação secundária ou maturação que pode ocorrer durante um intervalo de tempo variado (Lewis M. & Young T., 2002; Priest F. and Stewart G., 2006).

#### **2.1.11 Engarrafamento, encapsulação e rotulagem**

O engarrafamento é realizado em enchedoras manuais ou automáticas com capacidades diversas. O encapsulamento é realizado num equipamento designado por encapsuladora para garrafas com capacidade diversas (33 cL, 50 cL ou 75 cL).

A última etapa do processo de produção da cerveja artesanal é designada por rotulagem onde se procede à identificação do estilo da cerveja assim como outros parâmetros relacionados com a identificação do lote de cada cerveja.

### **2.2 Água**

A água é um dos ingredientes mais importantes para a obtenção de uma cerveja de qualidade, sendo esta uma solução altamente diluída de sais minerais. A maior parte destes sais são dissociados em iões devido às baixas concentrações presentes na água, podendo influenciar indiretamente a qualidade da cerveja, porque quando alguns destes iões quando presentes em concentrações superiores aos limites pretendidos podem afetar a várias etapas do processo cervejeiro. Assim sendo é conveniente que a água utilizada na produção de cerveja esteja devidamente tratada, cumprindo todos os requisitos para permitir uma boa qualidade do produto final (cerveja) (Esslinger H. & Narziss L., 2005).

### **2.3 Levedura**

Leveduras são seres eucariotas unicelulares, sendo classificadas como fungos, pois pertencem ao reino Fungi. Este microrganismo pode ser encontrado em diversos ambientes, pois contém uma excelente capacidade fisiológica de adaptação. Existem várias estirpes de levedura, apesar de umas estirpes serem mais adequadas que outras para diferentes processos de produção, como na produção de pão, vinho, cidra. Assim sendo é essencial usar a estirpe adequada para um certo processo de produção, visto que assim será mais eficiente (Bamforth C., 2003; Oliveira F. *et al.*, 2013).

Estes seres unicelulares são considerados heterotróficos, pois o anabolismo funciona em conjunto com o catabolismo, isto é, o metabolismo da levedura pode sintetizar moléculas mais complexas a partir de moléculas mais simples, como também pode ocorrer o caso contrário. Assim sendo, a energia na forma de ATP (Adenosina Trifosfato) produzida pela levedura (resulta da oxidação



de moléculas orgânicas) que é a sua fonte de energia, mas também poderão utilizar as moléculas orgânicas como fontes de carbono para a realização da biossíntese (Oliveira F. *et al.*, 2013).

Quanto à metabolização dos açúcares por ação da levedura, esta pode fazê-lo em condições aeróbias ou anaeróbias (presença ou ausência de O<sub>2</sub>). A metabolização dos açúcares em condições aeróbias é designada por respiração, em que acontece a reação da Equação 1 (Bamforth C., 2003).



Relativamente à metabolização dos açúcares em ambientes anaeróbios é indicada por fermentação alcoólica que segue a reação da equação 2 (Bamforth C., 2003).



As leveduras utilizadas no processo cervejeiro são designadas por *Saccharomyces*. As duas espécies mais utilizadas na produção da cerveja são: a *Saccharomyces cerevisiae* que é utilizada nas cervejas de fermentação alta (*ales*) e a *Saccharomyces pastorianus* que é usada nas cervejas de fermentação baixa (*lagers*). As leveduras são responsáveis pela fermentação alcoólica, metabolizando açúcares previamente obtidos dos amidos do malte em etanol e dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). (Bamforth C., 2003; Barth R., 2013).

## 2.4 Lúpulo

A primeira plantação de lúpulo com a finalidade de utilização na produção de cerveja ocorreu na Europa (mais precisamente na Alemanha e na República Checa) entre os anos 1000 e 1200 D.C (Bamforth C., 2003).

### 2.4.1 Planta

A espécie *Humulus Lupulus* é uma planta trepadeira perene (Figura 2) em que ambos os sexos estão em plantas diferentes (dióica), e pertencente à família de *Cannabaceae*. Só as plantas do sexo feminino são utilizadas no processo cervejeiro, porque só os cones de lúpulo (flor do lúpulo) da planta feminina é que conseguem segregar lupulina a partir das glândulas de lupulina (pó amarelo pegajoso), que é a parte mais importante do lúpulo na produção da cerveja, como vai ser explicado mais especificamente de seguida. A constituição química global destes cones de lúpulo secos está apresentada na Tabela 2 (Almaguer C. *et al.*, 2014; Priest F. and Stewart G., 2006).



**Figura 2** Plantação de lúpulo. Retirado de (<http://tierradecerveza.com/blog/el-misterioso-lupulo/>).

As formas mais comuns do lúpulo ser comercializado são: na forma de *pellets* (Figura 4), flor (cones de lúpulo) ou extrato, sendo que o mais utilizado no processo cervejeiro é o lúpulo na forma de *pellets*, tal como mostra a Figura 3 (EBlinger H., 2009).



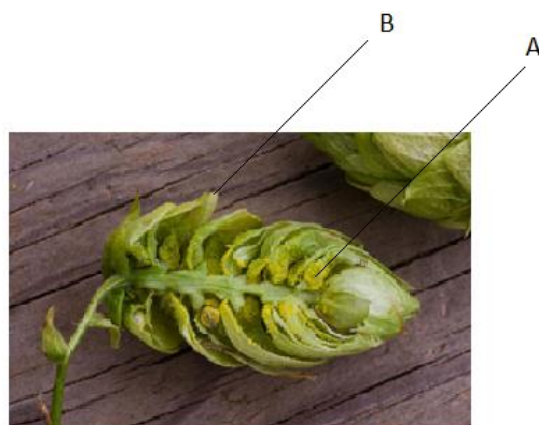
**Figura 3** Lúpulo em forma de pellets. Retirado de ("www.academiacervecera.com").

A utilização de lúpulo na forma de *pellets* na produção de cerveja tem uma série de vantagens, como: a capacidade de manuseamento desta matéria-prima, a facilidade de dispersão, extração e isomerização dos  $\alpha$ -ácidos presentes no lúpulo, visto que estes compostos estão presentes na lupulina e que as glândulas responsáveis pela sua produção são rompidas durante o processo de peletização. A peletização de lúpulo tem uma desvantagem importante, a oxidação por parte compostos constituintes da lupulina, pois a rutura das glândulas acelera a exposição e conseqüente a oxidação. Com o intuito de ultrapassar este obstáculo, realizaram-se estudos para melhorar as condições de embalagem e conseqüente armazenamento do lúpulo em forma de *pellets* (Clarke J., 1986).

A flor do lúpulo contém glândulas que produzem lupulina, e as brácteas que são as folhas que se ligam ao *strig*. Como se pode verificar na Figura 4 está apresentado um cone de lúpulo cortado transversalmente, conseguindo-se observar a distinção entre dois constituintes (Barth R., 2013).

A lupulina é um pó amarelo pegajoso (Figura 4 (A)), que é rico em óleos essenciais do lúpulo e resinas. As resinas podem ser divididas em resinas suaves (*soft resins*) e resinas fortes (*hard resins*)

(Barth R., 2013; Jaskula B. *et al.*, 2010). No Anexo I está representado um esquema com a constituição das resinas nos cones de lúpulo em geral.



**Figura 4** Cone de lúpulo cortado a meio, em que (A) representa a lupulina e (B) representa bráctea. Adaptado de (“www.academiacervecera.com”).

Os óleos essenciais do lúpulo podem ser divididos em três grupos de compostos: os compostos oxigenados, os hidrocarbonetos e os compostos que contêm enxofre. Os compostos oxigenados dividem-se em álcoois terpênicos, álcoois sesquiterpênicos e outro grupo referente a compostos variados (ésteres, cetonas, álcoois, entre outros). Os compostos que contêm enxofre repartem-se em tioésteres, sulfuretos (DMS – dimetilsulfido) e outros compostos contendo enxofre. Quanto aos hidrocarbonetos dividem-se em sesquiterpenos, terpenos e hidrocarbonetos alifáticos (Schönberger C. & Kostelecky T., 2011).

**Tabela 2** Composição química global dos cones de lúpulo secos. Adaptado de (Almaguer C. *et al.*, 2014)

Composto	Porcentagem (%)
Proteínas	15
Resinas Totais	15 a 30
Óleos Essenciais	0,5 a 3
Cinzas	8
Taninos (Polifenóis)	4
Pectinas	2
Monossacarídeos	2
Humidade	10
Celulose e restantes	43
Ceras e Esteróides	Vestígios a 25

Como já foi acima explicado as brácteas (pétalas) ligam-se ao *strig* e a maior parte dos polifenóis encontram-se nestes dois locais, à excessão dos prenilflavenoides. No Anexo I apresenta-se um esquema com a constituição dos polifenóis presentes nos cones de lúpulo (Almaguer C. *et al.*, 2014).

## 2.4.2 Colheita

A colheita do lúpulo é feita no final do verão quando os cones de lúpulo estão maduros. Estes são cortados, colhidos e submetidos a uma secagem em estufas para retirar a humidade existente (aproximadamente 80 %) até um nível entre 7 % e 12 %. O material indesejado é extraído e cortado em pedaços pequenos para eliminação ou é deitado novamente para a terra de plantação caso não exista suspeitas de pragas ou doenças. Na tabela 3 estão indicados alguns exemplos de pragas e doenças ocorridas no lúpulo (Priest F. *and* Stewart G., 2006).

**Tabela 3** Doenças e pragas que mais ocorrem no lúpulo. Adaptada de (Priest F. *and* Stewart G., 2006)

	Nome	Microrganismo	Causa
Pestes	<i>Damson hop aphid</i>	<i>Phorodon humuli</i>	Queda de folhas e danos nos cones de lúpulo
	Ácaro vermelho	<i>Tetranychus urticae</i>	Descloração das folhas e dos cones e posterior perda da colheita
Doenças	Mildio	<i>Pseudoperonospora humuli</i>	Germinação de esporos de fungos que causam uma descloração preta nas folhas
	<i>Verticillium wilt</i>	<i>Verticillium albo-atrum</i>	Doença fúngica que pode devastar seriamente o campo de plantação de lúpulo
	Oídio	<i>Podosphaera macularis</i>	Criação de pústulas brancas nas folhas e danos significativos nos cones

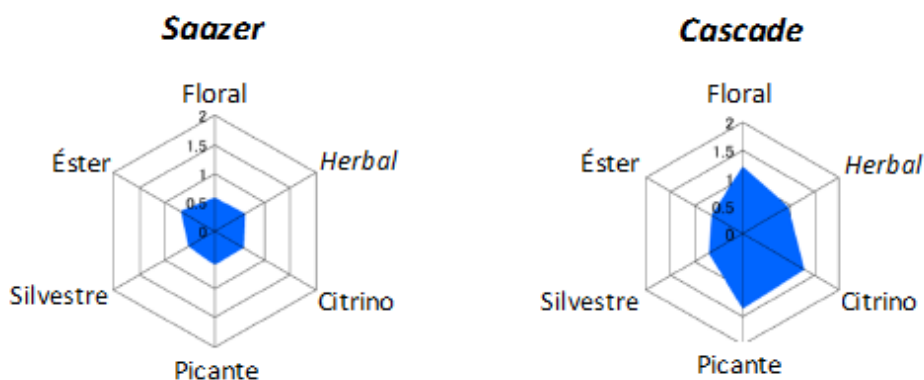
A temperatura do ar de secagem é normalmente fixada entre 60 °C e 75 °C, mas é necessário ser cuidadoso pois as resinas e os óleos podem sofrer degradação. O lúpulo é seco para evitar o crescimento de microrganismos e aumentar o seu tempo de conservação. Os melhores resultados de secagem ocorrem numa gama de temperaturas do ar mais baixas. Depois de esta etapa

estar finalizada, o lúpulo é arrefecido e condicionado à temperatura ambiente durante algumas horas, com vista a distribuir a humidade existente uniformemente pelo lúpulo. De seguida este é guardado em sacos em condições de vácuo, mantido a temperaturas baixas e protegido da luz, de forma a evitar a oxidação de alguns compostos (Priest F. and Stewart G., 2006).

### 2.4.3 Variedades de lúpulo

Existem várias variedades de lúpulo disponíveis, umas mais antigas e outras mais recentes. As variedades mais recentes têm sido mais produzidas e utilizadas que as mais antigas, visto que contêm novas propriedades qualitativas e maior resistência a doenças ou pragas. A recente diversificação das variedades de lúpulo tem outras vantagens para além das referidas, incluindo o aparecimento de variedades de lúpulos aromáticos que possibilitam a produção de receitas de cerveja artesanal mais diferenciadoras do ponto de vista organolético (Priest F. and Stewart G., 2006).

Antigamente as variedades de lúpulo eram divididas em três categorias de caracterização diferentes, como “aroma”, “*Dual purpose*” e “*High-alpha*”. Esta divisão já não ocorre pelo facto de já existirem variedades de lúpulo com boa qualidade de aromas e bons níveis de  $\alpha$ -ácidos e também de “*super high-alpha*” com aromas de qualidade moderada, por isso não há a necessidade de divisão nestas três categorias. Atualmente as características de aroma do lúpulo podem ser distinguidas em várias características, como por exemplo o floral, o picante, o citrino, o silvestre, o *herbal* e o éster, tal como mostra a Figura 5. Existem outras características de aroma para além das referidas (Inui T. *et al.*, 2013; Priest F. and Stewart G., 2006).



**Figura 5** Ilustração dos perfis de aromas de 2 variedades distintas o lúpulo *Saazer* e *Cascade*. Adaptado de (Inui T. *et al.*, 2013).

Os cervejeiros avaliam o lúpulo sensorialmente (*hand evaluation*) por métodos tradicionais e suportados por análises algo limitadas ao conteúdo de óleos e de  $\alpha$ -ácidos, que podem ser realizadas por técnicas de Cromatografia Gasosa (GC) e Cromatografia Líquida (HPLC). Alguns cervejeiros

especificam os níveis de  $\alpha$ -ácidos, e/ou alguns  $\alpha$ -ácidos específicos como o *cohumulone*, caracterizado por fornecer um amargor mais áspero à cerveja relativamente a outros  $\alpha$ -ácidos semelhantes. Assim sendo a análise e avaliação das novas variedades de lúpulo para posterior utilização tem de ser feita tanto a nível químico como a nível sensorial (Jaskula B. *et al.*, 2010; Priest F. and Stewart G., 2006).

Na Tabela 4 apresenta-se algumas tipos de lúpulo existentes referindo certas características de cada, observando então a diferença entre o conteúdo de  $\alpha$ -ácidos a cada variedade de lúpulo.

**Tabela 4** Características de alguns tipos de lúpulo diferentes. Adaptado de ("www.barthhaasgroup.com")

Nome	Origem	$\alpha$ -ácidos (%)	Variedade
<i>Saaz</i>	República Checa	3 a 6	Aroma
<i>Hallertauer Tradition</i>	Alemanha	4 a 7	Aroma
<i>Nugget</i>	E.U.A	11,5 a 14	<i>High-alpha</i>
<i>Brewers Gold</i>	Reino Unido	4,5 a 6,5	<i>Dual purpose</i>
<i>Galaxy</i>	Austrália	11 a 16	<i>Dual purpose</i>
<i>Summit</i>	E.U.A	16 a 18	<i>Super High-alpha</i>

Como se pode observar a Tabela 4 consta-se que existem lúpulos que diferem em algumas características, e além destas existem outras que não foram inseridas na tabela. Além destes lúpulos existem mais e originados noutros países, como a Polónia, França, entre outros (Briggs D. *et al.*, 1999).

#### 2.4.4 Novas variedades de lúpulo

O tempo de desenvolvimento e integração de novas variedades de lúpulo no mercado pode variar, pois depende do país do seu desenvolvimento. Devido ao facto de o país ter ou não doenças predominantes relacionadas com o lúpulo. Para um país que tenha uma doença destacada o desenvolvimento e integração de uma nova variedade de lúpulo pode demorar cerca de 10 anos, no entanto num país em que não acontece isso, este processo pode ser mais rápido. Em alguns casos nos países onde não existem doenças dominantes, o lúpulo pode ser registado e libertado para o mercado comercial antes de serem realizados ensaios e análises laboratoriais à cerveja o que favorece a celeridade do processo (Priest F. and Stewart G., 2006).

Com mais estudos e informação sobre os precursores de compostos chaves dos derivados de lúpulo responsáveis pelas características de aroma na cerveja, consegue-se definir estratégias de

implementação e de projeto, e assim fornecer informações culturais sobre a variedade de lúpulo a desenvolver (Inui T. *et al.*, 2013; Priest F. and Stewart G., 2006).

#### 2.4.5 Lúpulo *Super High-alpha*

Os produtores de plantas conseguiram nos últimos anos desenvolver lúpulos que contêm uma grande quantidade de  $\alpha$ -ácidos relativamente aos mais antigos. Estes lúpulos normalmente contêm valores de  $\alpha$ -ácidos entre 15 % a 16 % sendo possível atingir os 18 %, quando o lúpulo é cultivado em boas estações de crescimento. As variedades de lúpulo com este teor de  $\alpha$ -ácidos são designadas por lúpulos *Super High-alpha*. Apesar destas variedades de lúpulo apresentarem bom conteúdo em  $\alpha$ -ácidos, foi reportado posteriormente que estas variedades de lúpulo são susceptíveis a doenças, entre as quais o mildio e oídio que geram problemas de estabilidade no armazenamento. Com estas adversidades, foi necessário continuar a estudar e tentar desenvolver soluções para estes problemas (Priest F. and Stewart G., 2006).

#### 2.4.6 Química do lúpulo

##### 2.4.6.1 Polifenóis

Como já foi referido anteriormente a maioria dos polifenóis encontram-se nas pétalas e *strig*, com a excessão dos prenilflavenoides (como o *Xanthohumol*) que estão presentes na lupulina. Os polifenóis de baixo peso molecular são compostos importantes do lúpulo na produção de cerveja, pois estes interagem quimicamente com proteínas, diminuindo a formação de suspensões turvas (*hazes*), estas que são uma desvantagem para a estabilidade da cerveja. Além disso, estes conferem adstringência, amargor e corpo à cerveja. O conteúdo certo de polifenóis também pode contribuir para a estabilidade física da cerveja (Almaguer C. *et al.*, 2014; Priest F. and Stewart G., 2006).

Os polifenóis de baixo peso molecular encontram-se maioritariamente nos lúpulos de aromáticos do que nos de amargor, e são estes que evitam a oxidação e aumentam a estabilidade da cerveja (poder antioxidante). Os polifenóis de elevado peso molecular podem estar envolvidos na formação de suspensões turvas (*hazes*) e na alteração da cor da cerveja. Assim sendo consideram-se os polifenóis de baixo peso molecular mais importantes para a cerveja que os de elevado peso molecular, por isso os lúpulos de aroma são importantes no processo cervejeiro. O malte utilizado na produção é o que contribui com uma maior quantidade de polifenóis presentes no mosto (Almaguer C. *et al.*, 2014).

#### 2.4.6.2 *Xanthohumol*

O *xanthohumol* é um composto que pertence ao grupo dos prenilflavenoides. Este composto pode corresponder até 1.5% do peso total dos cones de lúpulo secos, onde antigamente se pensava que afetava a turvação da cerveja, sendo considerado como um fator negativo. Recentemente descobriu-se que o *xanthohumol* pode ter capacidades antimicrobianas e anticancerígenas. Assim sendo este composto suscitou grande interesse na indústria da cerveja, na medida que lúpulos que contenham elevado teor de *xanthohumol* são agora comercializados (Priest F. and Stewart G., 2006).

Este composto está presente nas glândulas de lupulina, onde também é encontrado numa quantidade mínima o prenilflavenoide *desmethylxanthohumol*. Os dois compostos são precursores das flavonas isoméricas, como o *isoxanthohumol* e os *prenylnaringenins* (Almaguer C. et al., 2014).

#### 2.4.6.3 Reação de isomerização

A reação de isomerização acontece no processo de fabricação de cerveja na etapa de ebulição do mosto (*boil*), onde alguns  $\alpha$ -ácidos são extraídos e termicamente isomerizados em iso- $\alpha$ -ácidos. Os  $\alpha$ -ácidos são caracterizados por conferirem um sabor de amargor à cerveja e são os compostos mais importantes das resinas de lúpulo. Com a reação de isomerização no processo a cerveja vai ficar com um sabor mais amargo, visto que os iso- $\alpha$ -ácidos têm um carácter mais amargo que os  $\alpha$ -ácidos. Além disso os iso- $\alpha$ -ácidos são mais solúveis que os  $\alpha$ -ácidos no mosto, sendo por isso uma vantagem, visto que os iso- $\alpha$ -ácidos contêm características como estabilizantes microbiológicas bastante favoráveis para a saúde dos consumidores da cerveja. Os iso- $\alpha$ -ácidos principais resultantes desta reação de isomerização são as *isocohumulone* (este que é o mais abundante no lúpulo), *isohumulone*, e *isoadhumulone*. Ainda existem outros iso- $\alpha$ -ácidos resultantes desta reação em quantidades mínimas designados por de *prehumulone* e *posthumulone* (Almaguer C. et al., 2014; Caballero I. et al., 2012; Jaskula B. et al., 2010; Priest F. and Stewart G., 2006).

Cada iso- $\alpha$ -ácido pode ser encontrado em duas formas distintas de estereoisómeros tanto na forma *cis* ou *trans*, como por exemplo o estereoisómero *cis-isohumulone* ou *trans-isohumulone*. As duas formas diferentes de estereoisómeros contêm diferentes características, como por exemplo um diferente potencial no que diz respeito à estabilidade da espuma, devido ao carácter hidrofóbico de cada um. Um excelente exemplo é a *trans-isohumulone* (mais hidrofóbica) aparecer em maior quantidade do que a *cis-isohumulone* (menos hidrofóbica) (Caballero I. et al., 2012).

Esta reação de isomerização dos  $\alpha$ -ácidos é facilitada por iões hidroxilo e catiões metálicos bivalentes, essencialmente o cálcio e magnésio. Se o mosto tiver baixo pH, vai ser necessário mais tempo em ebulição a uma temperatura maior para tentar atingir o máximo de produtos da reação de



isomerização. Depois de alguns iso- $\alpha$ -ácidos estarem formados, as melhores condições de mantê-los no mosto são: maior pH do mosto, menor gravidade do mosto e menor ritmo de lupulização (adição de lúpulo) (Opstaele F. *et al.*, 2012).

#### 2.4.6.4 Espuma e sabor amargo

Como já foi referido anteriormente os iso- $\alpha$ -ácidos conferem um sabor amargo à cerveja, mas também estão relacionados com a estabilização da espuma. Para além de estabilizarem a espuma, estes compostos também levam a uma maior formação de espuma na cerveja. Um dos compostos que é criado durante a reação de isomerização em quantidades significativas é a *isocohumulone*, este que é menos amargo e tem menos efeito na espuma do que a *isohumulone*. No que diz respeito aos isómeros dos iso- $\alpha$ -ácidos, o isómero cis é mais estável e mais amargo do que o isómero trans. Por sua vez o isómero trans move-se mais facilmente na espuma, aparecendo também em maior quantidade (Jaskula B. *et al.*, 2010; Priest F. and Stewart G., 2006).

Quanto ao sabor amargo na cerveja, no que diz respeito aos iso- $\alpha$ -ácidos, segundo Isabel Caballero e Carlos A. Blanco, a *isohumulone* confere mais amargor à cerveja do que a *isocohumulone*. Além disso os autores deste estudo também referem que um estereoisómero na forma cis atribui mais amargor do que na forma trans. Os iso- $\alpha$ -ácidos são os maiores responsáveis pelo sabor amargo presente na cerveja, aproximadamente 80 % (Caballero I. *et al.*, 2012).

#### 2.4.6.5 Importância da taxa de *cohumulone* na estabilização da espuma

O composto *cohumulone* está diretamente relacionado com a estabilidade da espuma da cerveja, por isso uma cerveja com um teor maior em  $\alpha$ -ácidos do que em  $\beta$ -ácidos também vai ter uma maior estabilidade da espuma, visto que o *cohumulone* é um  $\alpha$ -ácido. Por outro lado o composto *isocohumulone* vai conferir maior capacidade de produção de espuma do que os seus homólogos (*adhumulone* e *humulone*) (Priest F. and Stewart G., 2006).

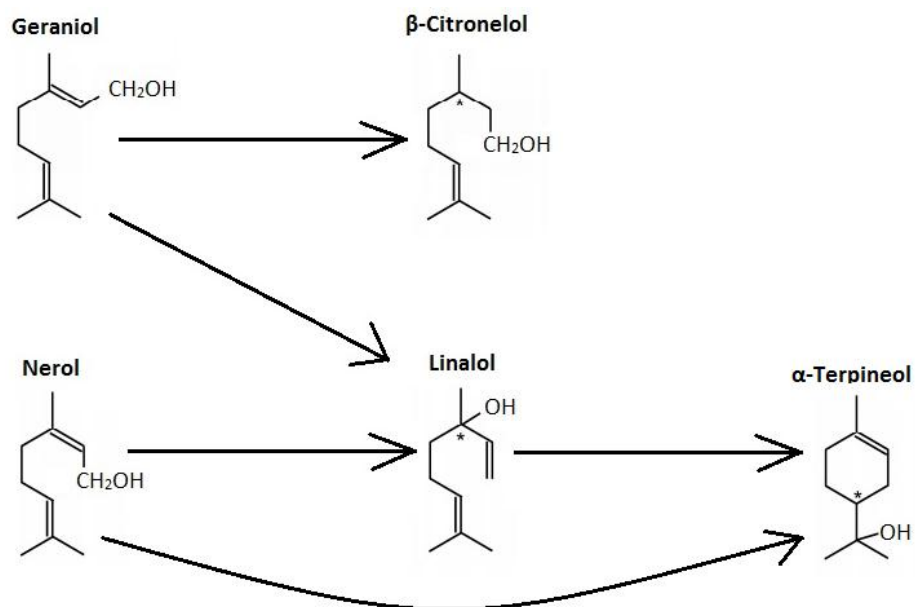
#### 2.4.6.6 Óleos Essenciais do Lúpulo – Álcoois Monoterpênicos

A fracção de óleos essenciais do lúpulo é considerada compostos voláteis aromáticos que estão presentes nas glândulas de lupulina, ao contrário das resinas (também presentes nestas glândulas) que são responsáveis pelo amargor (Almaguer C. *et al.*, 2014).

Como já foi referido anteriormente os óleos essenciais podem ser divididos em 3 grupos, os compostos oxigenados, os compostos que contêm enxofre e os hidrocarbonetos, e composição destes no lúpulo é dependente de cada variedade. Os compostos oxigenados contêm na sua constituição álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, ácidos e epóxidos (Almaguer C. *et al.*, 2014).

Neste estudo os compostos voláteis que se considerou importante caracterizar foram alguns dos álcoois monoterpênicos (que pertencem ao grupo dos álcoois). Alguns destes têm uma boa contribuição no que diz respeito ao aroma na cerveja, onde a maior parte destes provêm principalmente do Lúpulo. Alguns dos álcoois monoterpênicos que se consideram mais importantes na cerveja são: o Linalol, o Geraniol, o Nerol, o  $\alpha$ -Terpineol e o  $\beta$ -Citronelol (Takoi K. *et al.*, 2010).

Entre os álcoois acima referidos ocorre uma reação de biotransformação na cerveja por ação do metabolismo de leveduras, tanto do tipo *ale* ou *lager* como se pode verificar na Figura 6. Logo estas biotransformações ocorrem durante a etapa de fermentação no processo produtivo da cerveja (Takoi K. *et al.*, 2010).



**Figura 6** Biotransformação dos álcoois monoterpênicos, por ação do metabolismo das leveduras. Adaptado de (Takoi K. *et al.*, 2010).

A Figura 6 revela um esquema representativo das biotransformações que ocorrem ao nível dos álcoois monoterpênicos, no qual se observa que:

- O Geraniol pode-se converter em  $\beta$ -Citronelol ou Linalol;
- O Nerol transforma-se em Linalol ou  $\alpha$ -Terpineol;
- Uma parte do Linalol também pode formar o composto  $\alpha$ -Terpineol (Takoi K. *et al.*, 2010).

O linalol é o composto mais importante dos álcoois monoterpênicos e tem grande contribuição para o aroma da cerveja. Existem vários tipos de aromas com diferentes características, como por exemplo o linalol apresenta notas de aroma mais cítricas, frutadas e florais. O linalol é considerado um importante indicador no que diz respeito ao *hoppy flavor* (aroma a lúpulo ou lupulado) na cerveja, este

aroma que pode ser dividido em três características distintas, como: *hop oil*, *kettle hop* and *dry hop*. A contribuição do linalol para o aroma lupulado é maior quando se utiliza técnicas de lupulização de *late hopping*, ao contrário de *early hopping* pois este composto deverá volatilizar durante a etapa de ebulição do mosto (Almaguer C. *et al.*, 2014; Hanke S., 2009).

O aroma lupulado na cerveja tem sido considerado muito importante para os cervejeiros, na medida que favorecem uma melhor qualidade do sabor/aroma da cerveja. Por isso, para fornecer um bom aroma a lúpulo à cerveja, os responsáveis pela produção desta utilizam técnicas tradicionais de lupulização, e ainda adicionam o lúpulo no final do *boil* ou no *whirlpool* (*late hopping*) ou utilizam a técnica de *dry hopping* (Opstaele F. *et al.*, 2012).

#### **2.4.7 Análise do lúpulo**

Neste momento existem vários métodos de análise de lúpulo. Estes têm como objetivo analisar o poder de amargor do lúpulo, produtos de lúpulo ou a cerveja. Muitos destes métodos podem ser encontrados na literatura, onde estão continuamente a serem atualizados e melhorados. Alguns dos exemplos de literatura de bom nível e mais utilizados são: os ASBC *Methods of Analysis*, os Métodos de Análise do *Institute of Brewing* (que agora é conhecido como *Institute of Brewing & Distilling*), MEBAK *Methods* e *Analytica-EBC* (Priest F. and Stewart G., 2006).

##### **2.4.7.1 Avaliação física, visual e olfativa do lúpulo**

A avaliação física, visual e olfativa do lúpulo podem também ser designadas por um termo muito utilizado em inglês por *hand evaluation*. Esta avaliação é muito importante por parte dos produtores de cerveja, porque são eles que vão utilizar o lúpulo na sua produção e assim têm de ter o cuidado de usar um lúpulo sem doenças como o mildio, ou oídio. Para além disso, a percentagem de humidade do lúpulo também é um fator a ter em consideração, pois deve evitar-se que esta chegue a níveis extremamente baixos. Estas doenças e a percentagem de humidade do lúpulo podem afetar o sabor e a qualidade da cerveja. Estas avaliações devem ser efetuadas em locais com condições ambientais adequadas, como: a luminosidade (difusa e similar à luz do dia), boa ventilação e inodoro (Priest F. and Stewart G., 2006).

#### **2.4.8 Técnicas de lupulização**

O grande valor do lúpulo na cerveja situa-se nas resinas e nos óleos essenciais que o constituem. Pela técnica tradicional alguns lúpulos são adicionados ao mosto no *boil* durante 1 h ou 2 h, para conferirem amargor final à cerveja. Visto que alguns dos óleos essenciais são suscetíveis de evaporarem mediante longos períodos de exposição a longas temperaturas é necessário realizar a

adição de lúpulo de formas alternativas, quer no final do *boil* (*late hopping*), ou na cuba de fermentação ou barril (*dry hopping*) por forma a garantir a presença de tais compostos no produto final (Briggs D. *et al.*, 1999).

No entanto, a grande vantagem da aplicação de diferentes técnicas de lupulização poderá ser a perspectiva da maior conservação da cerveja durante o seu tempo de prateleira. Outra vantagem é a escolha por parte do cervejeiro em selecionar várias técnicas na produção da cerveja, conferindo assim várias características à cerveja (Palmer J., 2001).

#### 2.4.8.1 Técnica Tradicional

Na técnica tradicional de lupulização a adição do lúpulo é feita durante a etapa de ebulição, por isso o lúpulo pode ser adicionado ao longo desta etapa, como no início (*early kettle*), no meio (*middle boil*). A técnica ao ser realizada no início (*early kettle*), o lúpulo estará em contacto com o mosto durante 1 h ou 2 h, de forma a conferir amargor à cerveja. Consequentemente ao longo tempo de exposição do lúpulo às temperaturas da etapa de ebulição do mosto, os compostos voláteis presentes no lúpulo acabam por evaporar. Estes compostos voláteis pertencem aos óleos essenciais do lúpulo e concedem aroma à cerveja, logo adicionando o lúpulo no início da ebulição do mosto será pouco o aroma concedido à cerveja, o que se pode verificar analisando a Figura 7. Assim é conveniente adicionar lúpulos de amargor no início da ebulição do mosto (Lermusieau G. *et al.*, 2001; Peltz M., 2015).



**Figura 7** Relevância do aroma e amargor na cerveja, consoante o tempo de adição do lúpulo na etapa de ebulição do mosto.

Observando a Figura 7 entende-se que quanto mais tarde o lúpulo for adicionado na etapa de ebulição, mais aroma e menos amargor vai ser concebido à cerveja, por causa do tempo de contacto do lúpulo a temperaturas elevadas.

#### **2.4.8.2 Mash Hopping**

Esta técnica visa a adição do lúpulo durante a brassagem, logo as temperaturas a que esta técnica acontece são antes de se obter 80 °C. Com a adição do lúpulo realizada nesta etapa pouco amargor vai ser conferido à cerveja, pois a estas temperaturas os  $\alpha$ -ácidos presentes no lúpulo não sofrerão a reação de isomerização na etapa de ebulição. Isto deve-se ao facto de o mosto ser filtrado antes da etapa de ebulição e conseqüentemente o lúpulo ficará retido no filtro juntamente com o *drêche*. Relativamente aos compostos aromáticos a maior parte serão volatilizados durante a ebulição do mosto. Assim sendo esta técnica tem como a finalidade de serem criados compostos de aroma que não são voláteis à ebulição e conferir sabor sem amargor à cerveja ("www.beersmith.com").

#### **2.4.8.3 First Wort Hopping**

Neste tipo de técnica a adição do lúpulo realiza-se antes da etapa de ebulição, e depois da filtração do mosto, onde as temperaturas deverão ser aproximadamente abaixo dos 80 °C. Sabe-se que a maior parte dos compostos voláteis presentes nos óleos de lúpulo são insolúveis, assim sendo a estas temperaturas por algum tempo existem alguns destes compostos voláteis presentes que não se evaporam, o que vai contribuir então para a oxidação de alguns destes compostos voláteis, tornando-os solúveis no mosto. Para a utilização desta técnica sugere-se a utilização de mais de 30 % da quantidade de lúpulo total que irá ser adicionado durante a ebulição do mosto, e com pouco teor de  $\alpha$ -ácidos para não exagerar no nível de amargor (Palmer J., 2001).

Esta técnica de lupulização pode contribuir para que no final o sabor amargo da cerveja seja mais macio e contenha um aroma mais apurado (Palmer J., 2001).

#### **2.4.8.4 Final da ebulição (*late hopping*)**

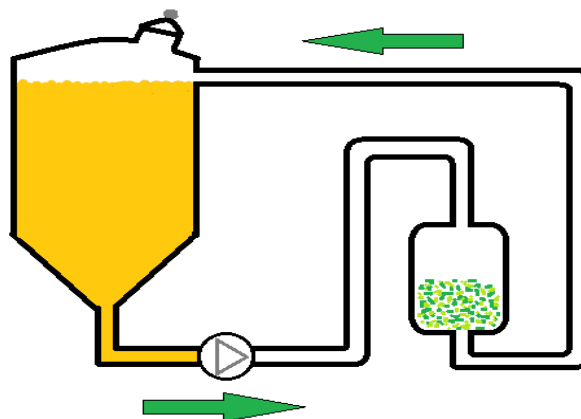
Esta técnica pertence à técnica tradicional de lupulização, visto que a adição de lúpulo ocorre no final da etapa da ebulição do mosto. A aproximadamente 10 min / 15 min do final da etapa de ebulição ou menos o lúpulo também pode ser adicionado (técnica referenciada também como *late hopping*) com o objetivo de fornecer mais aroma à cerveja, como consequência da adição nesta fase da produção, a dosagem de lúpulo adicionada não fornecerá grande nível de amargor à cerveja. Tal acontecimento pode ser explicado pelo pouco tempo de contacto que as resinas (contêm os  $\alpha$ -ácidos) do lúpulo estiveram a temperaturas, o que foi pouco tempo para a reação de isomerização dos  $\alpha$ -ácidos. Logo poucos ou nenhuns iso- $\alpha$ -ácidos (mais amargos e mais solúveis que os  $\alpha$ -ácidos) se vão dissolver no mosto (Briggs D. *et al.*, 1999; Palmer J., 2001).

#### 2.4.8.5 *Whirlpool Hopping (late hopping)*

A realização da técnica de lupulização *whirlpool hopping* ocorre entre a etapa de ebulição do mosto e o arrefecimento, onde tal como o nome indica o lúpulo será adicionado à cuba de centrifugação (*whirlpool*). Esta técnica não fornece nenhum amargor à cerveja, visto que a temperatura é mais baixa do que na etapa de ebulição do mosto, por isso dificultando a reação de isomerização. Contudo a adição do lúpulo nesta etapa irá ter uma boa contribuição de aroma na cerveja final, como por exemplo aromas mais frutados/florais e cítricos (Peltz M., 2015).

#### 2.4.8.6 *Hop Back (late hopping)*

Esta técnica de lupulização é uma alternativa ao *whirlpool hopping*. A técnica de *hop back* tem como objetivo recircular o mosto quente através de um equipamento especializado, como por exemplo uma cuba de menor volume. Este equipamento está preenchido com lúpulo (retido numa rede, servindo como um leito), como se pode verificar na Figura 8 (Peltz M., 2015).



**Figura 8** Técnica de lupulização usando um sistema de recirculação (*Hop Back*), adaptado ("www.maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt," 2014).

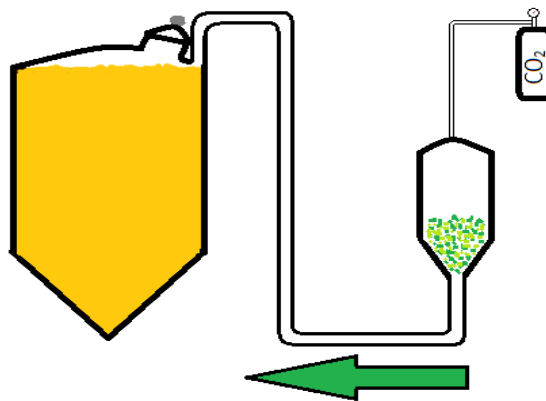
Sendo esta técnica análoga à do *whirlpool hopping*, também só fornece aroma à cerveja em vez de amargor. Segundo o autor John Palmer sugere-se que o aroma que se consegue no final da etapa de ebulição tem de ser o desejado e suficiente, porque senão com a realização de *hop back* pode notar-se aromas a ervas ou vegetais, visto que a utilização desta técnica pode suscitar este tipo de aromas (Palmer J., 2001).

#### 2.4.8.7 *Dry Hopping*

A técnica de lupulização *dry hopping* consiste na adição de lúpulo a temperaturas baixas (técnica a frio) à cuba durante a fermentação, ou maturação ou no barril. Esta técnica é utilizada para

fornecer principalmente aroma tropical ou resinoso e algum sabor à cerveja (Barth R., 2013; Parkin E., 2014; Peltz M., 2015).

Na adição de lúpulo durante a etapa de fermentação pode ocorrer na fase inicial ou final da fermentação, mas o mais indicado é no final, visto que os compostos aromáticos do lúpulo podem volatilizar com o gás (CO<sub>2</sub>) formado durante a fermentação por ação da levedura. A Figura 9 mostra como se deve proceder corretamente à adição de lúpulo à cuba de maturação. Além disso o cervejeiro pode optar se o lúpulo é adicionado na presença ou não de levedura, e o tempo de contacto do lúpulo com a cerveja (podendo ficar desde umas horas até semanas) (Palmer J., 2001; Peltz M., 2015).



**Figura 9** Adição de lúpulo à cuba de fermentação/maturação recorrendo à pressão por dióxido de carbono, adaptado de (“www.maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt,” 2014).

Outra possibilidade é aplicação de pressão para a entrada de lúpulo na cuba permitindo que a cerveja final não tenha qualquer contacto com oxigénio, impedindo a sua possível degradação na etapa de maturação, como se pode observar na Figura 9 (“www.maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt,” 2014).

## 2.5 Fatores que influenciam o tempo de prateleira da cerveja

A estabilidade do sabor/aroma da cerveja ao longo do tempo da cerveja artesanal é muito importante para o consumidor, assim sendo é necessário tentar manter a estabilidade do sabor/aroma. Os fatores de impacto na mudança do sabor/flavor na cerveja são o oxigénio, a temperatura de armazenamento, a luz e a quantidade de substâncias antioxidantes presentes (Decker E. *et al.*, 2010).

O contacto da cerveja com o oxigénio deve-se evitar ao máximo depois da etapa de fermentação primária, para reduzir o risco de reações de oxidação.

As temperaturas acima dos 4/5 C também devem ser evitadas para reduzir o risco de refermentações (síntese de subprodutos por ação da levedura que contribuem para o sabor/aroma da cerveja) e oxidações (Caballero *et al.*, 2012; Decker E. *et al.*, 2010).

Quanto maior a quantidade de substâncias antioxidantes, menor será o risco de ocorrer oxidações ao longo do tempo de prateleira da cerveja. As reações de oxidação que mais se verificam na cerveja durante o seu armazenamento são: oxidação de ácidos gordos insaturados, álcoois superiores, degradação de ácidos de amargor do lúpulo, degradação de aminoácidos, reação de Maillard, condensação Aldol e formação de Acetal (Decker E. *et al.*, 2010).

No Capítulo 4. Discussão de Resultados, explica-se as causas mais específicas de algumas destas reações.



## 3 Materiais e Métodos

### 3.1 Materiais

A actividade experimental pode ser dividida e classificada em 3 partes concretas:

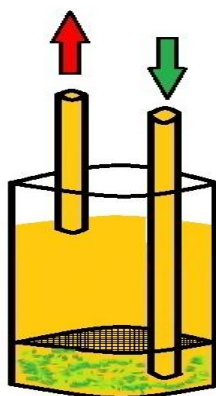
- Numa 1ª fase, análise química e sensorial das diferentes técnicas de lupulização com lúpulo Saaz e água em frascos com concentração de lúpulo de 2 g/L, designadas por extracções aquosas;
- A 2ª etapa corresponde à aplicação de 3 técnicas de lupulização na produção de 3 cervejas (cada uma com uma técnica diferente) de uma receita cerveja artesanal do tipo *Pilsner*;
- Por último (3ª fase), avaliação química e sensorial das cervejas ao longo tempo de prateleira e retirar as respetivas conclusões.

#### 3.1.1 Avaliação das diferentes técnicas de lupulização nas extracções aquosas

Para a avaliação de diferentes parâmetros de lupulização, adicionou-se 1,5 g de lúpulo *Saaz* a frascos ( $V = 1L$ ) com 0,75 L de água. Em cada um dos frascos o lúpulo foi adicionado a tempos e temperaturas diferentes, com o objetivo de fazer corresponder uma técnica de lupulização diferente, realizadas em paralelo. A cada frasco deu-se diferentes nomes: *Mash*, *Pré-Boil*, *Boil I*, *Boil M*, *Boil F*, *Whirlpool*. Na Tabela 5 estão referidas as técnicas de lupulização correspondentes a cada frasco das extracções aquosas.

Em paralelo foram efetuados mais dois testes com extracções aquosas em frascos com a mesma concentração de lúpulo, correspondendo às técnicas de lupulização: *Dry Hopping* e Recirculação a Frio. No frasco do *Dry Hopping* adicionou-se lúpulo à temperatura da água da rede da empresa. Na Recirculação a Frio teve como objetivo fazer passar a água sempre com o mesmo caudal através pequena bomba centrífuga, por um equipamento que envolve o lúpulo (recirculação), que durou 17 h aproximadamente. Na Figura 10 está representado um esquema do *setup* utilizado para a esta técnica de lupulização. Este *setup* também se utilizou para a extração aquosa de Recirculação Quente, que está abaixo explicada.

Para o ensaio com recirculação quente a água foi aquecida e mantida a uma temperatura idêntica à do *Whirlpool*. O lúpulo situa-se preso na parte inferior dum equipamento servindo como leito para a passagem de água quente, como se verifica na Figura 10.



**Figura 10** Instalação (*Setup*) da técnica de recirculação (tanto a frio ou a quente) com as extrações aquosas.

Como já foi acima referido, observando a Tabela 5 pode-se verificar o nome das técnicas de lupulização correspondente a cada extração aquosa.

**Tabela 5** Nome das técnicas de lupulização utilizadas nas extrações aquosas e respetivas temperaturas da adição do lúpulo

Nome	Técnica de lupulização correspondente	Temperatura de adição (°C)	Tempo de adição (min)	Tempo de contacto (min)
<i>Mash</i>	<i>mash hopping</i>	66,3	0	60
<i>Pré-Boil</i>	<i>first wort hopping</i>	65,5	60	Até ao fim
<i>Boil I</i>	<i>early kettle</i>	93,2	95	Até ao fim
<i>Boil M</i>	<i>midle hopping</i>	95,1	140	Até ao fim
<i>Boil F</i>	<i>end of boil (late hopping)</i>	95,3	185	Até ao fim
<i>Whirlpool</i>	<i>Whirlpool hopping (late hopping)</i>	80,5	205	Até ao fim
Recirculação Quente	<i>hop back (late hopping)</i>	80,4	-	17
Recirculação Fria	-	21,2	-	1020
<i>Dry hopping</i>	<i>Dry hopping</i>	21,2	-	1020

No final as amostras aquosas foram respetivamente guardadas em cada um dos frascos a temperaturas baixas (próximas de 4 °C) para evitarem contaminações, até serem avaliadas por métodos físico-químicos e sensoriais.

Relativamente às extrações aquosas Recirculação Fria, Recirculação Quente e *Dry hopping* não se efetuaram-se as avaliações acima referidas, porque as extrações aquosas Recirculação Fria e *Dry*

*Hopping* antes de serem analisadas apresentaram indícios de contaminação e turvação. Assim sendo decidiram-se utilizar apenas as técnicas de lupulização em mosto quente.

### 3.1.2 Produção das cervejas recorrendo às técnicas de lupulização escolhidas

A produção das três cervejas a partir do mosto de uma receita de cerveja artesanal do tipo *Pilsner* ocorreu no dia de produção deste lote de cerveja. Retirou-se um volume de 50 L deste mosto antes da etapa de ebulição para uma cuba com a mesma capacidade volumétrica, como mostra a Figura 11. Depois dividiu-se este volume de mosto por mais duas cubas idênticas (originando um volume de mosto em cada panela aproximadamente 17 L), e assim se prosseguiu para as restantes etapas essenciais para a produção de cerveja artesanal.



**Figura 11** Cubas de produção de cerveja.

As três produções de cerveja em cada uma das cubas diferenciam-se no tipo de técnica de lupulização utilizada: *Boil Hopping*, *Whirlpool Hopping* e Recirculação a Quente (*hop back*). Estas cervejas foram produzidas a partir de um mosto com uma concentração de 1,6 g/L de lúpulo *Hallertauer Hersbrucker* e *Nugget*, ao qual foi adicionado lúpulo *Saaz* à concentração de 2 g/L, seguindo os tempos e as temperaturas das respetivas técnicas de lupulização para cada cerveja.

As temperaturas a que as cervejas sofreram as técnicas de lupulização foram:

- 87,3 °C para o *boil hopping*, o lúpulo foi acrescentado na fase final do *Boil* (*boil F*);
- 80,2 °C para o *whirlpool hopping*;
- 78,6 °C para o início da recirculação quente e parou-se a recirculação a 51,7 °C.

Depois de realizadas as etapas do processo de produção até à etapa de fermentação primária, efectuou-se então a transferência do mosto final para três fermentadores com capacidades

volumétricas de 20 L cada um Cada fermentador utilizado era constituído por um *airlock* para permitir a saída de CO<sub>2</sub> e evitar a entrada de O<sub>2</sub> ou partículas para o fermentador.

Após transferência e arrefecimento dos mostos, inoculou-se com a levedura do tipo *lager Safflager* da marca Fermentis com uma quantidade de 3,83 g respetivamente a cada um dos fermentadores, para se dar início à etapa de fermentação primária.

Nos 9 dias seguintes, monitorizou-se o °Brix de cada fermentação, com o fim de assegurar a fermentação primária e poder assim prosseguir para a etapa de maturação, também designada por fermentação secundária. Finalizada a fermentação primária, iniciou-se a maturação teve uma duração de 28 dias a uma temperatura média de 4,37 °C.

No final desta etapa as cervejas estavam aptas para serem engarrafadas, mas antes disso foi necessário adicionar açúcar com uma concentração de 4 g/L de açúcar a cada fermentador e agitar cada um. De seguida as cervejas foram então engarrafadas e armazenadas à temperatura ambiente (Temperatura aproximadamente de 21 °C) durante 2 semanas, para se promover a refermentação em garrafa. Esta técnica de adição de açúcar com a finalidade de ocorrer a refermentação em garrafa designa-se de *priming*, que neste caso teve como objetivo a formação de gás (CO<sub>2</sub>) na cerveja por ação do metabolismo da levedura residual presente (Bamforth C., 2003; Baxter E. and Hughes P., 2001).

Considerou-se também importante guardar cerca de 4 L de cerveja em garrafas (V=33 cL) de cerveja do tipo *Pilsner* do Lote de produção, de onde se retirou o mosto utilizado nas produções à escala piloto. Identificaram-se estas amostras de cerveja como cerveja de controlo e serviu de comparação em relação às cervejas produzidas. Ao mosto da cerveja de controlo foram adicionados vários lúpulos utilizando diferentes técnicas de lupulização, como mostra a Tabela 6.

**Tabela 6** Tipos de lúpulos, técnicas de lupulização e respetivas concentrações de lúpulo, na produção da cerveja de controlo

Nome do lúpulo	Concentração de lúpulo (g/L)	Técnica de lupulização
<i>Hallertauer Hersbrucker</i>	1	<i>Mash hopping</i>
<i>Nugget</i>	0,6	<i>Early kettle</i>
<i>Saaz</i>	1 e 3	<i>Midle e Late hopping</i>

### 3.1.3 Avaliação da estabilidade da cerveja ao longo do tempo de prateleira

Uma semana depois, iniciaram-se as análises físico-químicas e sensoriais às cervejas ao longo do tempo de prateleira. A análise do °Brix, pH, condutividade elétrica e estabilidade da espuma foram

efetuadas 5 vezes nos seguintes dias da análise: 0; 15; 30; 45 e 90. No entanto a análise por HPLC, GC-MS, FRAP e IBU só foram realizadas no tempo inicial e final do ensaio (ti e tf).

### 3.2 Monitorização das cervejas durante o tempo de prateleira

#### 3.2.1 Análise da Estabilidade da Espuma

A análise da espuma realizou-se a partir do método de *Rudin*, em que se retirou 20 cL de amostra de cerveja para uma proveta em acrílico designada de *Foam-Analiser* (FA). Este equipamento (Figura 12) contém ainda um difusor de CO<sub>2</sub> na base para se realizar a sua injeção à pressão de 0,2 bar, com o objetivo de converter a cerveja em espuma. Assim a espuma ascendeu até ao topo do equipamento FA. Quando esta chegou ao topo fechou-se a válvula de injeção de gás, colocou-se um corpo oco e esférico em cima da espuma e iniciou-se a contagem do tempo através de um cronómetro. Depois esperou-se que a espuma descesse até a linha azul traçada no FA, parou-se a contagem do tempo e anotou-se o tempo que demorou.



**Figura 12** Equipamento *Foam-Analiser*.

De modo a obter a velocidade que a espuma da cerveja demora desde o topo até à linha azul do FA, dividiu-se 40,5 cm (comprimento do topo até à linha azul do FA, como mostra a Figura 12) pelo tempo demorado de cada espuma em cada amostra de cerveja.

### 3.2.2 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica tem como finalidade medir a força iônica, mas também pode determinar a concentração de químicos de uma solução aquosa. A avaliação deste parâmetro realizou-se através de um aparelho de medição designado por PHD-1 da marca PCE (Figura 13), em que após a ligação do dispositivo inseriu-se uma sonda na amostra de cerveja que se pretendeu analisar e registou-se os valores obtidos (“www.Hyfoma.com”).

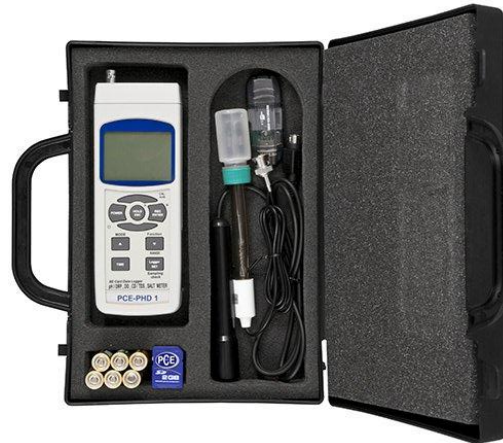


Figura 13 Aparelho PHD-1 da marca PCE.

Este aparelho para além de analisar a condutividade elétrica também tem a capacidade de medir a percentagem de sal e o pH de soluções.

### 3.2.3 Medição do pH

A medição do pH tem como objetivo medir o grau de acidez ou alcalinidade de uma solução aquosa e realiza-se através do medidor de pH IP-57 da marca ALLAFRANCE (Figura 14).



Figura 14 Medidor de pH.

Primeiro retirou-se uma amostra de cerveja para um gobelet e agitou-se este para retirar o CO<sub>2</sub> dissolvido na cerveja. De seguida foi necessário calibrar o equipamento de medição de pH, através das

soluções-tampão fornecidas juntamente com o aparelho, seguindo o manual de instruções. Depois do equipamento estar calibrado procedeu-se à medição do pH na amostra e registou-se o valor.

### 3.2.4 Análise do °Brix

A análise do °Brix realizou-se através de um refratómetro digital MA871 da *Milwaukee* (Figura 15), que tem como finalidade medir os sólidos solúveis numa solução aquosa. Visto que a amostra que se pretendeu analisar foi cerveja e os sólidos solúveis maioritários são os açúcares, logo a medição do °Brix neste caso é indicadora da quantidade de açúcares presentes nas amostras de cerveja (Mignani A. *et al.*, 2013).



Figura 15 Refratómetro digital MA871 da Milwaukee.

Inicialmente calibrou-se o instrumento de medição do grau °Brix colocando uma porção de água destilada na célula do refratómetro tapando-a totalmente e marcando como zero no aparelho. Assim que se terminou a calibração, limpou-se a célula do refratómetro e colocou-se uma amostra de cerveja nas mesmas condições, registando-se o valor obtido.

## 3.3 Monitorização da cerveja no início e no fim do experimento (Ti e Tf)

### 3.3.1 HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

A técnica de HPLC é um processo de separação de cromatografia líquida de elevada eficiência, em que a amostra é conduzida por um eluente líquido designado por fase móvel, através de um adsorvente líquido (fase estacionária). (Genisheva Z. *et al.*, 2014).

A análise dos compostos maioritários da cerveja efectuou-se por HPLC, na qual se identificou e quantificou o etanol usando um cromatógrafo (*Jasco*) equipado com um detetor (*Jasco 830-RI*) de refração *index* (RI), um detetor de UV-visível (*Jasco 870–UV-visível*) e uma coluna *87 H Chrompack* (7,8 mm × 300 mm) a 60 °C. Foram utilizados 5 mmol/L de ácido sulfúrico como eluente, a um caudal de 0,7 mL/min e um volume de injeção de 20 µL. O etanol foi identificado utilizando um detetor RI.

### 3.3.2 Extração dos compostos voláteis

Num tubo de cultura de 10 ml (*Pyrex*, ref.1636/ 26MP), adicionou-se 8ml da solução preparada, a 100 µl de padrão interno (4-nonanol, *Merck* ref. 818773) e uma barra de agitação magnética (22,2 mm x 4,8 mm).

A extração foi realizada por agitação da amostra com 400 mL de diclorometano (*Merck*, ref. 1,06050) durante 15min, com recurso a um agitador magnético. Após o arrefecimento a 0 °C durante 10 min, a barra de agitação magnética foi removida e a fase orgânica foi isolada por centrifugação (RCF=4000, 7 min, 7 °C), sendo o extrato recuperado num frasco, com o auxílio de uma pipeta de *Pasteur*. De seguida, realizou-se a secagem do extrato aromático com sulfato de sódio anidro (*Merck*, ref. 1,06649) e recolheu-se novamente para um novo frasco. Cada solução foi extraída em triplicado.

### 3.3.3 GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrography*)

A utilização de cromatografia gasosa (GC-MS) teve como finalidade a separação, identificação e quantificação de compostos voláteis minoritários. Para se realizar a identificação dos componentes o equipamento GC-MS deve seguir os passos de injeção, separação e deteção.

Este equipamento era constituído por uma cromatógrafo *Varian* 3400 e um espectrófotometro de massa (*ion-trap*) *Varian Saturn II*. Injetou-se 1 µl de amostra numa coluna capilar, revestida com um *CP-Wax 52 CB* (50 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,2 µm, *Chrompack*). A temperatura do injetor (SPI) foi programada de 20 °C a 250 °C, a 180 °C/min. A temperatura do forno foi mantida a 40 °C, durante 5 min. De seguida, programou-se a temperatura para aumentar de 40 °C a 250 °C, a 3 °C/min. Após 20 min a 250 °C, programou-se a temperatura para aumentar de 250 °C a 255 °C a 1 °C/min. O gás transportador utilizado foi o hélio N60 (Ar líquido) a 103 kPa, correspondendo a uma velocidade linear de 15,5 cm/s a 150 °C. O detetor foi ajustado para o modo de impacto eletrónico (70eV), com um intervalo de aquisição de 29 m/z-360 a m/z, e uma taxa de aquisição de 610 ms.

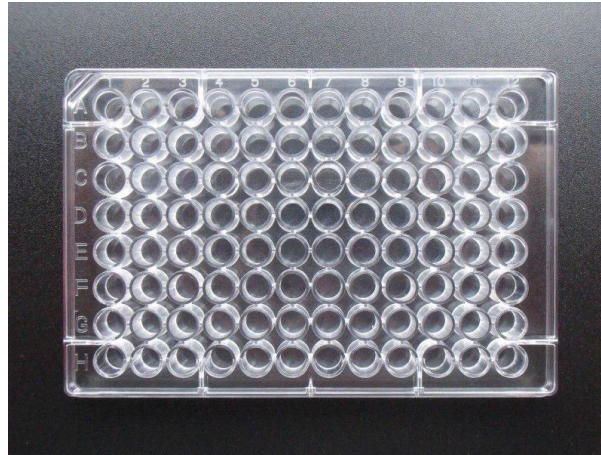
### 3.3.4 IBUs (*International Bitterness Units*)

O IBU é a unidade internacional de amargor e foi medido pelo método experimental da EBC (*European Brewing Convention*) *Analytica method* 9.8. A EBC é uma das principais organizações científicas ao nível internacional, responsáveis pela investigação de fabricação da cerveja. Assim sendo seguindo o protocolo deste método analítico da EBC, esta análise revelou o nível de amargor presente em cada amostra de cerveja (European Brewery Convention, 2004).

De acordo com o método analítico 9.8 da EBC, primeiro retirou-se 1 volume de cada de cerveja para frascos diferentes e acidificaram-se com duas gotas de HCl (40 mM) em cada um. Depois



adicionou-se o dobro de volume da amostra da cerveja de iso-octano e agitou-se durante 15 min a 120 rpm (rotações por minuto) e 30 °C. Com a agitação dada como terminada, pipetaram-se 300 µL das amostras de cada frasco para poços de uma placa de Elisa (Figura 16) em duplicado (European Brewery Convention, 2004).



**Figura 16** Placa de Elisa de 96 poços.

No final inseriu-se a placa de Elisa num espectrofotómetro-UV e leu-se a absorvência a 275 nm, registaram-se os resultados obtidos e multiplicaram-se por 50 para converter os valores para unidades internacionais de amargor (IBU).

### 3.3.5 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

A atividade antioxidante está relacionada com o poder redutor. Os compostos com poder redutor podem reduzir compostos intermediários oxidados e actuar como antioxidantes primários ou secundários (He G. *et al.*, 2012).

Para medir a atividade antioxidante realizou-se o teste FRAP, em primeiro lugar é necessário preparar as soluções padrão. Preparar uma solução aquosa dissolvendo 0,0139 g de sulfato de ferro (FeSO<sub>4</sub>) em 25 mL de água destilada. De seguida preparar soluções-padrão de água destilada com concentrações diferentes da solução aquosa (200 µM, 400 µM, 600 µM, 800 µM, 1000 µM, 1500 µM e 2000 µM) (Mussatto S., 2010).

Depois das soluções padrão estarem devidamente preparadas, teve de se efectuar o reagente FRAP misturando as seguintes soluções: solução de TPTZ (2,4,6-tris (1-pyridyl)-5-triazine), solução de FeCl<sub>3</sub> e solução-tampão de acetato (a pH 3.6), estas com uma proporção de 1:1:10 (v/v/v) (Mussatto S., 2010).

O protocolo para a realização de cada uma das soluções utilizadas no reagente FRAP foram:

- Solução de TPTZ (10 mM) - adicionou-se 156,15 mg de TPTZ com 50 mL de HCl (com concentração de 40 mM);
- Solução de HCl (40 mM) - Dilui-se 320 µL de HCl concentrado em 100 mL de água destilada;
- Solução de FeCl<sub>3</sub> (20 mM) – Dissolve-se 162,20 mg FeCl<sub>3</sub> com 50 mL de água destilada;
- Solução-tampão de acetato (0,3 M) – Dissolve-se 3,1 g de acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa) com 16 mL de ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) em 1 L de água (pH = 3.6).

Relativamente às amostras das cervejas tiveram de ser microfiltradas (Mussatto S., 2010).

De seguida pipetou-se para a placa de Elisa 10 µL de cada amostra de cerveja e 290 µL de reagente FRAP, depois a placa foi incubada a 37 °C durante 15 min. Por fim mediu-se a absorvância a 593 nm e registou-se os valores obtidos.

### 3.3.6 Análise Sensorial

A análise sensorial das quatro cervejas (*Boil*, *Whirlpool*, *Recirculação Quente* e *Controlo*) foi realizada por cinco indivíduos. Nesta análise os cinco provadores tiveram preencher as fichas de provas sensoriais para cada uma das cervejas. Na página seguinte está apresentada a ficha de prova sensorial que cada provador preencheu para cada uma das cervejas

### Ficha de Prova Sensorial

<b>Aparência</b>	0-10	Observações
Cor		
Clarity / Turbidity		
Foam		
Qualidade visual		

<b>Aroma/Odor</b>	0-10	Observations
Frutado		
Solvente		
Papel/Cartolina		
Caramelizado		
Sulfuroso		
Floral (lúpulo)		
Qualidade de aroma		

<b>Sabor</b>	0-10	Observações
Doce		
Amargo		
Azedo		
Ácido		
Lupulado		
Torrado		
Qualidade de sabor		

<b>Sensação</b>	0-10	Observações
Adstringente		
Quente		
Corpo		
Carbonatação		
Qualidade da sensação na boca		

Qualidade Global (0-10)	
-------------------------------	--



## 4 Discussão dos resultados

### 4.1 Extrações Aquosas

#### 4.1.1 Análise sensorial das extrações aquosas

As extrações aquosas realizadas tiveram como objetivo retirar melhores conclusões de que tipos de técnicas de lupulização se iriam utilizar na produção das cervejas. Assim sendo avaliaram-se estas extrações ao nível sensorial, como se observa no gráfico da Figura 17. As análises sensoriais foram efetuadas de forma a cumprir os requisitos mínimos para uma boa avaliação, num espaço inodoro, com boa ventilação e luminosidade (Priest F. and Stewart G., 2006).

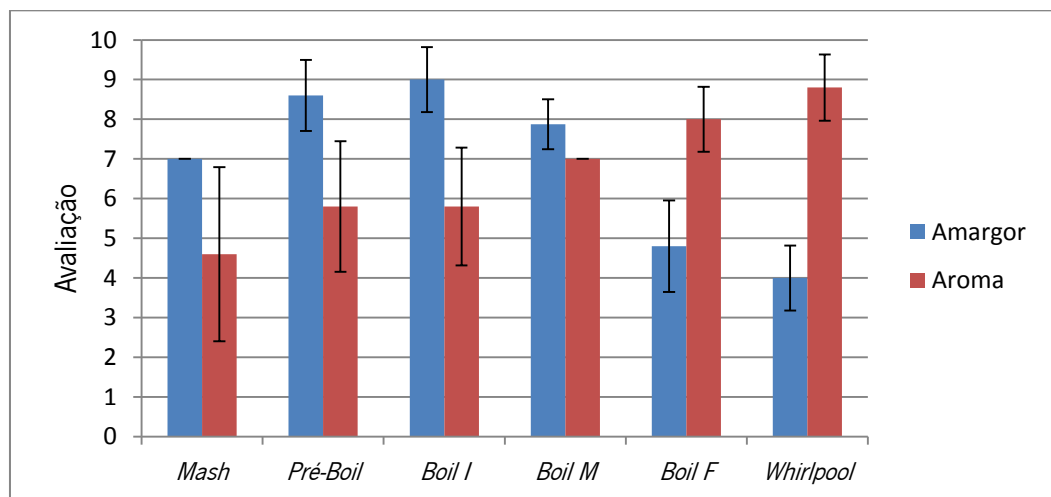


Figura 17 Avaliação das extrações aquosas ao nível de amargor e aroma.

Em termos sensoriais verificaram-se que as extrações aquosas que continham melhor qualidade aromática foram as soluções do *Whirlpool* e do *Boil F*, por outro lado as soluções avaliadas como mais amargas foram as do *Pré-Boil* e do *Boil I*. A solução Boil M foi a solução hídrica em que o nível de amargor e aroma foram idênticos, na ordem dos 7. Os resultados foram coerentes com a literatura, uma vez que quanto mais cedo for adicionado o lúpulo ao mosto mais amargor (menos aroma) este conferirá à cerveja, exceto quando adicionado à brassagem (*mash hopping*), esta adição que corresponde à extração *Mash*. No capítulo 2.5.8 Técnicas de Lupulização encontra-se uma explicação mais aprofundada sobre a variação do aroma e amargor consoante as técnicas de lupulização utilizadas.

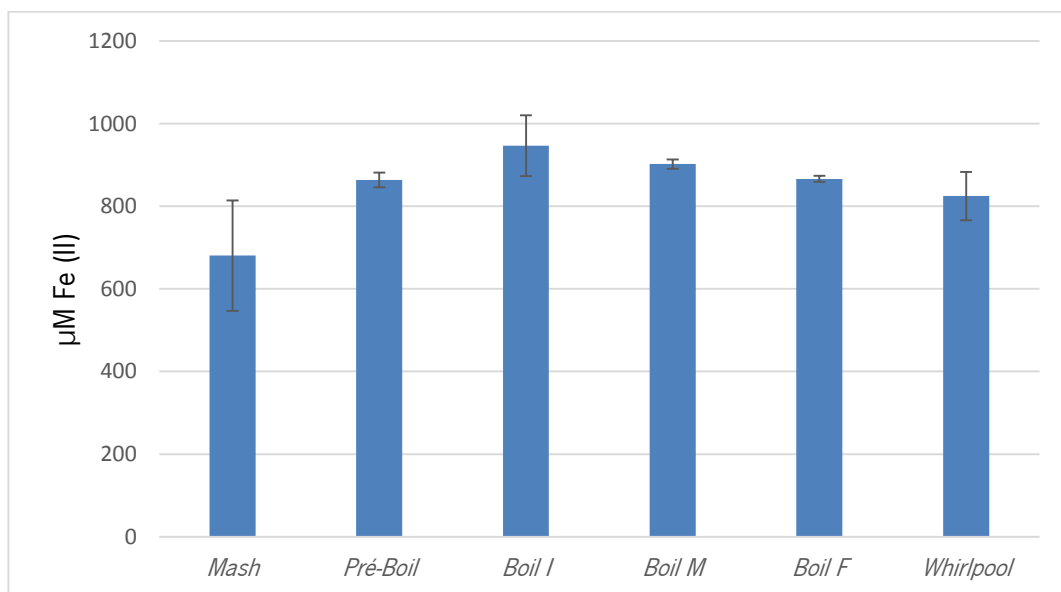
O nível de amargor a que foi avaliado sensorialmente a extração *Mash* é a 4<sup>a</sup> melhor das amostras das cervejas. Visto que as temperaturas da etapa de brassagem se realizaram entre 65,4 °C e 66,3 °C (1 h antes de filtrar), logo são baixas para ocorrer a reação de isomerização dos  $\alpha$ -ácidos

presentes no lúpulo. Assim sendo, a explicação para este amargor está nos  $\alpha$ -ácidos que foram dissolvidos na cerveja *Mash* antes de se filtrar, sendo depois sintetizados em iso- $\alpha$ -ácidos por reações de isomerização. Quanto ao resultado sensorial aroma do *Mash* apresenta desvios grandes, logo não se pode retirar uma conclusão exata (Almaguer C. *et al.*, 2014).

Conforme os resultados obtidos das avaliações sensoriais das extrações aquosas, concluiu-se que as técnicas de lupulização mais eficientes em termos aroma são as *late hoppings* (*Boil F* e *Whirlpool*), por outro lado as mais vantajosas em amargor são *first wort boiling* e *early kettle hopping* (*Pré-Boil* e *Boil I*).

#### 4.1.2 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

A análise FRAP teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante das diferentes extrações aquosas, como está apresentado na Figura 18. Observa-se que as extrações que contêm maior poder oxidante são as que se adicionam lúpulo no início e a meio do *Boil*. Contudo as extrações aquosas entre o *Pré-Boil* e o *Whirlpool* podem ter um poder antioxidante idêntico, porque as extrações *Boil I* e *Whirlpool* apresentam desvios consideráveis.



**Figura 18** Análise do poder antioxidante das extrações aquosas.

A amostra *Mash* é a que apresenta o poder antioxidante mais baixo, uma vez que os compostos presentes no lúpulo não se dissolveram tanto, devido às temperaturas mais baixas a que esteve até ser filtrado.

Com a avaliação deste parâmetro às extrações aquosas verifica-se que para melhorar o poder antioxidante de uma cerveja, deve-se adicionar lúpulo por *first wort hopping* ou durante toda a ebulição do mosto.

#### 4.1.3 IBU

Como já foi dito anteriormente IBU é a unidade internacional de amargor e pode ser medido seguindo o método experimental da EBC.

A Figura 19 revela o nível de amargor (IBU) em variadas soluções de água com lúpulo adicionado a diferentes tempos e temperaturas, como no caso da adição de lúpulo à cerveja utilizando diferentes técnicas de lupulização.

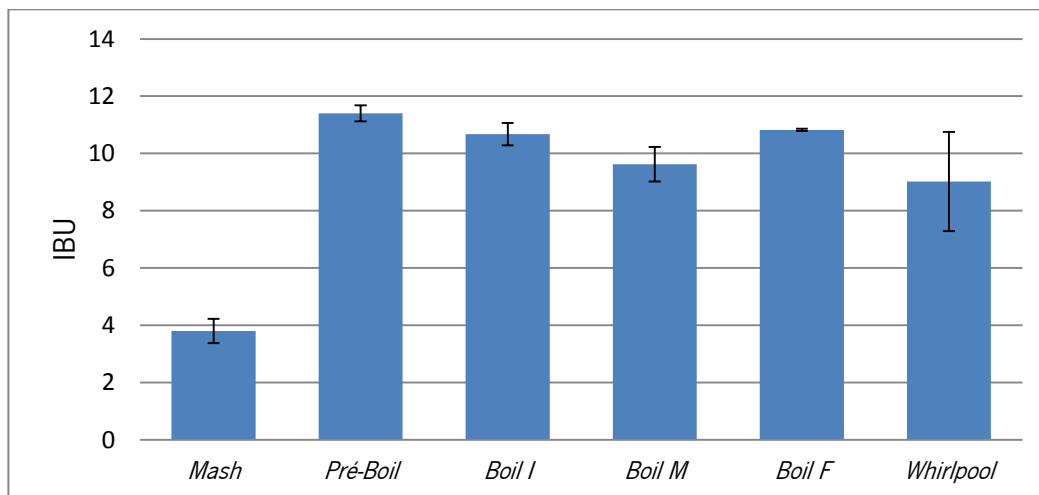


Figura 19 Avaliação dos IBUs das extrações aquosas.

Observando a Figura 19 verifica-se que a extração *Mash* é a que revela ter menos amargor comparativamente com as restantes. A causa deste nível de amargor é compreendida, porque esta solução foi filtrada ao final de 1 h, tal como acontece no final da etapa de brassagem na produção de cerveja. Como isto acontece antes da etapa de ebulição, existem compostos presentes no lúpulo que se dissolvem, porque para além do pouco tempo de contacto do lúpulo com a água, a amostra *Mash* não atingiu as temperaturas elevadas da etapa de ebulição do mosto. Como já foi dito anteriormente os  $\alpha$ -ácidos sofrem reações de isomerização durante essa etapa originando iso- $\alpha$ -ácidos, estes que são mais solúveis e mais amargos. Segundo o estudo realizado por Wietstock P. *et al.*, a amostra onde foi adicionado lúpulo no *Mash* não teve bom rendimento de substâncias amargas no ensaio que realizaram. Apesar disso essa amostra teve bons valores de IBU, devido ao lúpulo adicionado no início

do *boil* conferindo então mais amargor a essa amostra. (Opstaele F. *et al.*, 2012; Wietstock P. *et al.*, 2015).

Relativamente às restantes extracções aquosas, na Figura 19 observa-se que as amostras *Pré-Boil*, *Boil I* (início da ebulição) e o *Boil F* são as que contêm mais IBUs por ordem decrescente. Como era de esperar quanto mais cedo o lúpulo é adicionado ao mosto depois da etapa de filtração, maior será o amargor, porque as elevadas temperaturas da ebulição do mosto vão contribuir para a reações de isomerização dos  $\alpha$ -ácidos em iso- $\alpha$ -ácidos. Os iso- $\alpha$ -ácidos são mais solúveis em água e também mais amargos que os  $\alpha$ -ácidos (Briggs D. *et al.*, 1999).

Assim sendo seria de esperar que em valores de IBUs fossem de ordem decrescente: *Pré-Boil*, *Boil I*, *Boil M*, *Boil F* e por fim *Whirlpool*. Tais resultados não foram obtidos na avaliação dos IBUs, uma vez que se obteve os segundos maiores valores IBUs na amostra *Boil F*.

Quanto ao valor de IBUs da extracção aquosa *Whirlpool* não permite tirar conclusões devido ao elevado erro observado.

#### 4.1.4 Análise de compostos voláteis

Como já foi dito no Capítulo 3.3.3 a utilização de cromatografia gasosa (GC-MS) teve como finalidade a separação, identificação e quantificação de compostos voláteis. Neste estudo decidiram-se quantificar dois compostos indicadores do aroma a lúpulo na cerveja, que pertencem ao grupo dos álcoois monoterpênicos designados por linalol e  $\alpha$ -terpineol. Analisaram-se estes dois compostos para as extracções aquosas para o tempo inicial (ti) deste ensaio se pode visualizar na Figura 20.

Segundo as características do linalol era essencial quantificar este composto utilizando diferentes técnicas de lupulização. Quanto ao  $\alpha$ -terpineol também se pretendeu estudar, porque este composto envolve-se nas biotransformações dos álcoois monoterpênicos na cerveja, por ação do metabolismo das leveduras. Assim sendo, um aumento da concentração deste composto ao longo do armazenamento das cervejas, poderia indicar refermentações em garrafa. Outro aspeto relevante para a análise do  $\alpha$ -terpineol é saber que nas biotransformações dos álcoois monoterpênicos, o linalol só pode ser convertido em  $\alpha$ -terpineol, como já foi referido no capítulo 2.5.6.6 (Takai K. *et al.*, 2010).

Através da Figura 20 verifica-se que a concentração do  $\alpha$ -terpineol em todas as extracções aquosas apresenta baixos valores de concentração comparativamente com o linalol, exceto na amostra *Whirlpool*, onde as concentrações destes compostos são idênticas. O valor da concentração linalol nesta amostra duvidoso, visto que até o *Mash* tem uma concentração maior. Como já foi referido anteriormente, o linalol é um composto volátil que pertence aos óleos essenciais do lúpulo, logo a



extração *Mash* era a que deveria ter menos concentração deste composto, pois passa por todas as etapas do processo o que origina uma maior volatilização destes compostos.

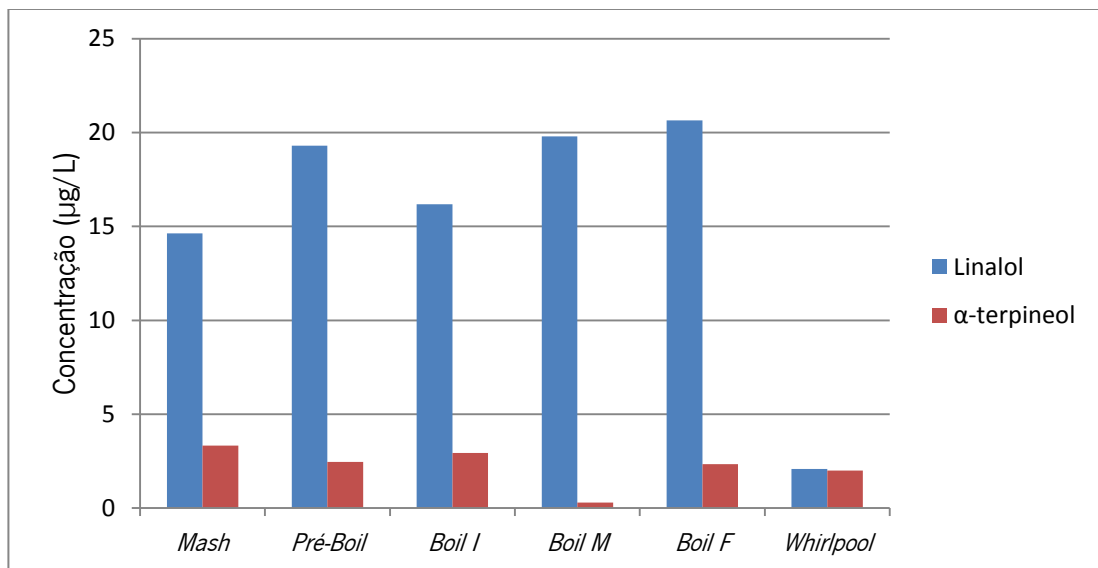


Figura 20 Concentração do linalol e do α-terpineol nas extrações aquosas.

As soluções que a seguir obtiveram maiores valores de concentração de linalol foram a *Boil F*, a *Boil M* e a *Pré-Boil*. Segundo um estudo realizado por Filip Van Opstaele e Jessika De Clippeleer, as cervejas que se utilizaram *late hopping* como é o caso das extrações aquosas *Boil F* e *Whirlpool* têm uma enorme diferença relativamente ao conteúdo de linalol presente, apresentando concentrações muito superiores deste composto em relação às cervejas que utilizaram *midle hopping* (como acontece na solução *Boil M*). Por esta razão esperava-se encontrar menos concentração de linalol na solução *Boil M* e *Pré-Boil*, e mais na solução *Whirlpool* que obteve valores muito baixos provavelmente por erros experimentais (OPSTAELE F. *et al.*, n.d.).

Em relação ao estudo realizado por Christina Schmidt e Stefan Hanke, os dois autores concluíram que as cervejas realizadas por *early hopping* (adição de lúpulo de no início da etapa de ebulição do mosto) revelam ter não só concentrações mínimas de linalol, mas também de outros álcoois monoterpênicos quando comparadas às outras cervejas utilizando outras técnicas de lupulização. Assim sendo, era de esperar que neste ensaio que as soluções *Mash*, *Pré-Boil* e *Boil I* fossem as que obtivessem menos quantidade deste composto volátil (Schmidt C., n.d.).

Sendo considerada a concentração de linalol obtida na extração *Whirlpool*, sugere-se uma nova realização desta extração para analisar este composto por GC-MS.

#### 4.1.5 Escolha das 3 técnicas de lupulização na produção das cervejas

A realização e análise das extrações aquosas utilizando diferentes tempos e temperaturas de adição de lúpulo teve como objetivo escolher 3 técnicas de lupulização para a produção de 3 cervejas referentes a este projeto de estudo, que foram: *Boil* (adição de lúpulo no fim da ebulição), *Whirlpool* (*whirlpool hopping*) e Recirculação Quente (*hop back*).

As técnicas recirculação fria, recirculação quente e *dry hopping* foram efetuadas mas não analisadas, porque verificou-se a existência de turvação e indícios de contaminação nas amostras em que se adicionaram lúpulo a frio. Assim sendo decidiram-se adicionar lúpulo apenas em mosto quente, de modo a conferir mais estabilidade na cerveja, logo escolheu-se a recirculação quente.

A adição do lúpulo no fim da ebulição do mosto foi preferida devido aos bons resultados das análises em termos de aroma a lúpulo (linalol) e poder antioxidante. Relativamente à característica de amargor, a análise de IBU foi contraditória relativamente à sensorial, o que suscitou também algum interesse.

A técnica de lupulização *whirlpool hopping* escolheu-se devido ao melhor aroma apresentado na análise sensorial. Além disso, achou-se importante escolher esta técnica pois é análoga à técnica de lupulização *hop back*.

#### 4.2 Análise do °Brix durante a produção das cervejas

Com o intuito de controlar a fermentação das cervejas produzidas neste ensaio, considerou-se avaliar o °Brix destas ao longo da fermentação, como mostra a Figura 21.

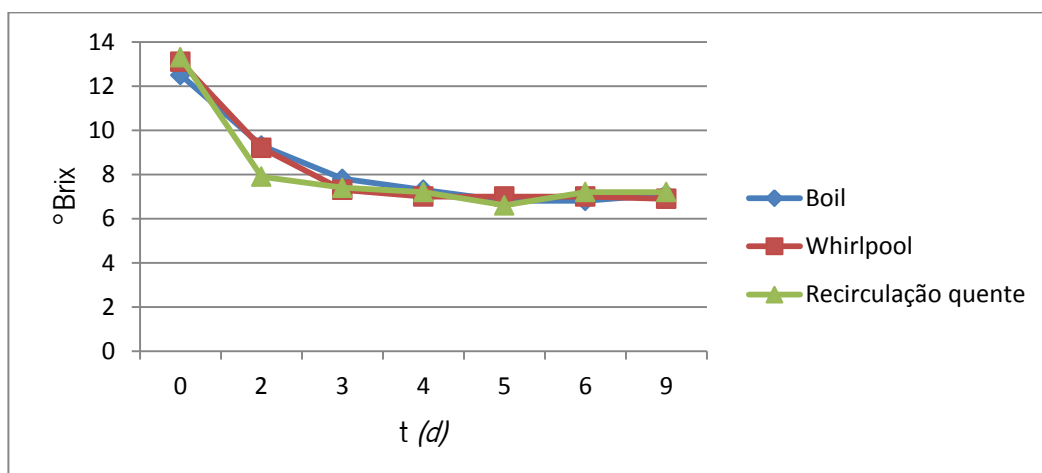


Figura 21 Avaliação do °Brix durante o tempo de fermentação.

Analisando o gráfico da Figura 21 verifica-se que os valores do °Brix decrescem nos 3 dias iniciais e permanecem sensivelmente constantes nos dias seguintes.

Os resultados obtidos do °Brix mostram que a fermentação foi realizada rapidamente, o que pode ser justificado pelas temperaturas elevadas (temperaturas entre 19 °C e 22,5 °C) a que as cervejas estiveram durante este tempo de fermentação. Visto que as cervejas em questão são cervejas do tipo *lager*, em que se utilizaram leveduras de baixa fermentação, a temperatura de fermentação a que estas deveriam ter sido submetidas seriam entre 6 °C e 15 °C (Bamforth C., 2003).

### 4.3 Monitorização das cervejas ao longo do tempo de prateleira

#### 4.3.1 °Brix

Conforme o descrito acima as medições dos valores de °Brix também ajudam a perceber se houve refermentações em garrafas durante o armazenamento das mesmas. Assim sendo efectuou-se medições do °Brix 5 vezes ao longo do tempo de prateleira das cervejas, tal como mostra a Figura 22.

O primeiro dia de avaliação do °Brix corresponde ao final de 2 semanas depois de ter sido realizado o *priming*. Como já foi referido anteriormente no capítulo 3, o *priming* é uma técnica que consiste na adição de açúcares à cerveja na garrafa (antes do engarrafamento) ou no barril. Esta técnica pode ter dois objetivos diferentes, como por exemplo: conferir doçura à cerveja final ou conceder gás (CO<sub>2</sub>) à cerveja por refermentação em garrafa, pelo comando da levedura residual existente. (Bamforth C., 2003; Baxter E. and Hughes P., 2001).

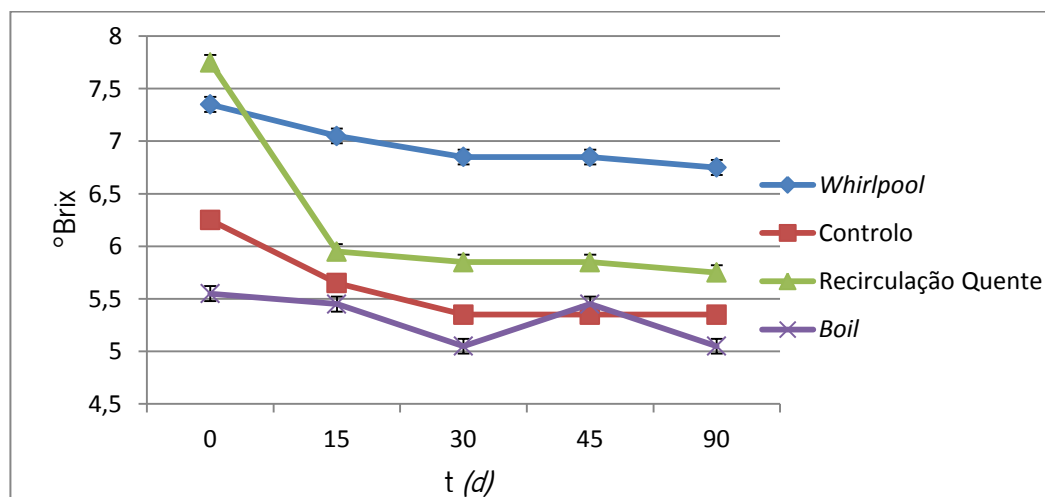


Figura 22 Análise do Brix ao longo do tempo de prateleira das cervejas.

O gráfico da Figura 22 revela que a concentração de açúcares tendeu a baixar ligeiramente longo do tempo de prateleira em todas as cervejas menos na amostra “Recirculação Quente”, em que se observa um decréscimo acentuado ao final dos primeiros 15 dias. Estes decréscimos indicam que

existiu consumo de açúcares por parte da levedura residual, confirmando a existência de refermentação em garrafa.

#### 4.3.2 pH

A medição do pH é uma avaliação da acidez ou alcalinidade de uma solução aquosa, logo é um critério importante para a cerveja, visto que esta é uma bebida. O pH mede a quantidade de iões de hidrogénio, logo quanto maior for a quantidade deste iões numa solução, mais ácida será a respetiva solução. Este parâmetro poderá influenciar várias características na qualidade da cerveja final, como na estabilidade espuma, sabor e brilho, por estas razões considerou-se importante analisar o pH ao longo do tempo de prateleira das cervejas (Figura 23) (Baxter E. *and* Hughes P., 2001; Esslinger H. & Narziss L., 2005).

As temperaturas elevadas de armazenamento podem ter influenciado a estabilidade da cerveja negativamente, como o abaixamento do pH e algumas reações de oxidação. Os vários tipos de reações de oxidação que podem acontecer são: degradação oxidativa de ácidos de amargor do lúpulo e de ésteres de acetato, oxidação de terpenos, auto-oxidação de ácidos gordos, oxidação de álcoois, reações de *Maillard*, degradação oxidativa de grupos carbonilo, entre outros. No caso dos  $\alpha$ -ácidos que como já foi referido anteriormente são os ácidos de amargor do lúpulo, a sua solubilidade na cerveja depende do pH. Para valores de pH maiores como acontece no mosto, estes ácidos serão terão uma solubilidade maior do que na cerveja, visto que esta tem um pH inferior ao mosto. A maior parte dos  $\alpha$ -ácidos existentes no mosto sofrem reações de isomerização durante a etapa de ebulição do mosto (*boil*), dando origem assim a produtos de isomerização designados por iso- $\alpha$ -ácidos, ou então são removidos na etapa de fermentação, contribuindo para a cobertura de espuma da cerveja. Os iso- $\alpha$ -ácidos formados pelas reações de isomerização são mais solúveis, contêm o mesmo nível de amargor e são mais estáveis para o valor de pH da cerveja, do que os  $\alpha$ -ácidos (Bamforth C., 2003; Heuberger A. *et al.*, 2012; Moreira N. *et al.*, 2013).

Como se pode verificar no gráfico da Figura 23 a maior parte dos valores de pH das análises realizadas estão compreendidos no intervalo esperado (4,3 a 4,6). A amostra do *Whirlpool* no dia 30 e as da Recirculação Quente e do *Boil* no dia 45 ultrapassaram minimamente os limites dos valores do pH expectáveis de acordo com a literatura, não sendo muito consideráveis (Esslinger H. & Narziss L., 2005).

O pH das cervejas *Whirlpool* e Controlo mantiveram-se relativamente constantes ao longo do tempo de prateleira, por outro lado o pH das restantes cervejas tendeu a diminuir. Uma vez que as

temperaturas de armazenamento das cervejas ao longo do tempo de prateleira foram altas (19 °C a 22,5 °C), pode explicar a diminuição do pH para as cervejas referidas.

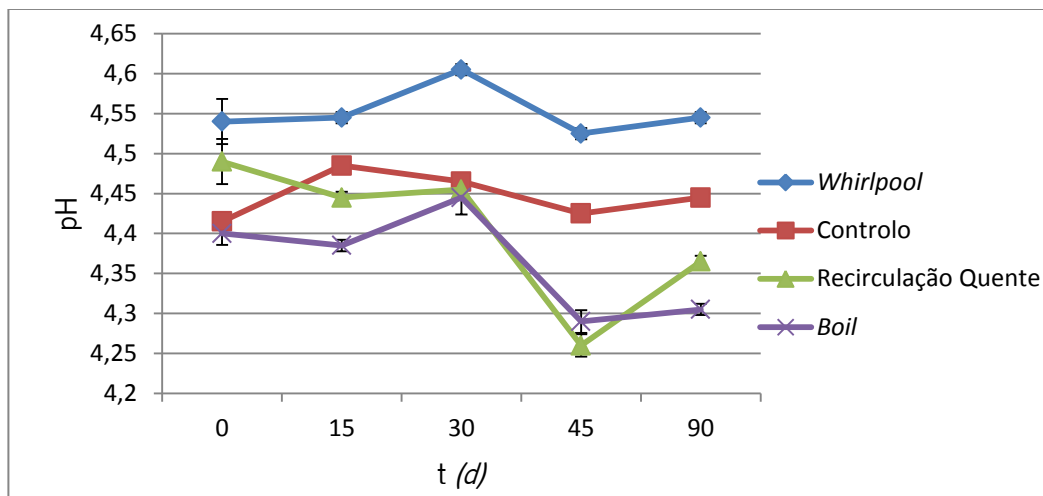


Figura 23 Dados do pH ao longo do tempo de prateleira das cervejas.

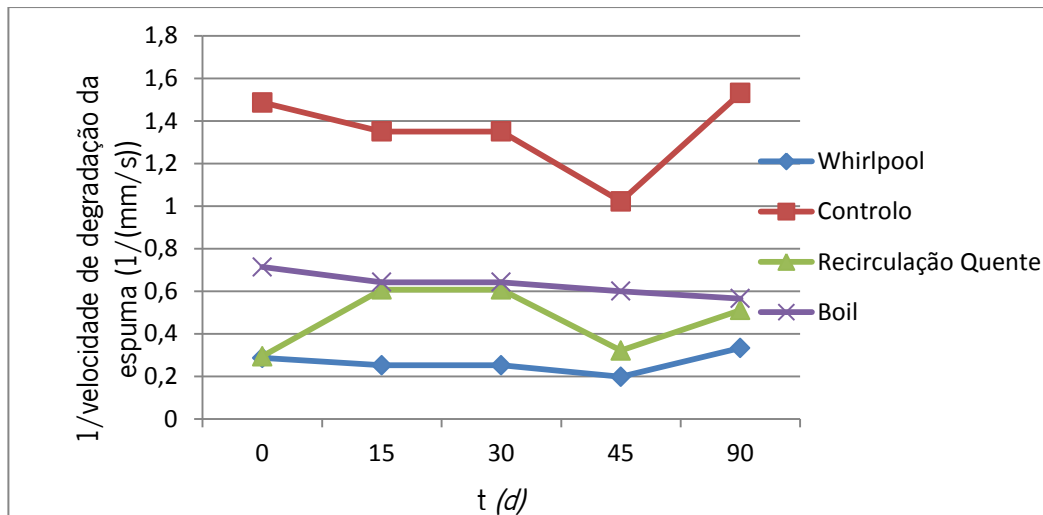
As diminuições de pH verificadas durante a análise das amostras das cervejas ao longo do tempo de prateleira podem indicar a formação de subprodutos, como ácidos orgânicos por ação da levedura. Assim sendo, estas observações podem ser explicadas por refermentações em garrafa que podem ter sido influenciadas pelas temperaturas elevadas de armazenamento das cervejas (Barth R., 2013).

#### 4.3.3 Estabilidade da Espuma

A avaliação da qualidade da espuma não é fácil devido à sua heterogeneidade e por ser transitória, visto que a espuma é sistema que compreende uma fase contínua (líquido ou sólido) e descontínua (gás). Os componentes presentes na espuma da cerveja que podem afetar tanto positiva como negativamente são: as proteínas ou polipeptídeos, os ácidos responsáveis pelo amargor do lúpulo (iso- $\alpha$ -ácidos), os álcoois, os lípidos, os polifenóis, o pH, os cátions de metal, a composição do gás e as melanoidinas. Na Figura 24 estão os resultados do ensaio realizado consoante o método de *Rudin*, com o objetivo de avaliar a estabilidade da espuma medindo a velocidade de degradação da espuma. Quanto maior for o inverso da velocidade de degradação da espuma implica uma maior estabilidade da espuma (Baxter E. and Hughes P., 2001).

Relativamente à Figura 24 verifica-se que a cerveja de Controlo é a que apresenta melhor estabilidade da espuma. Analisando a cerveja *Whirlpool* pode-se observar que a estabilidade da espuma é a pior relativamente às restantes cervejas.

A diminuição da estabilidade da espuma ao longo do tempo da cerveja de Controlo pode ser justificada segundo o estudo de Bamforth C. and Kanauchi M., quanto maior for o amargor da cerveja, maior será a estabilidade da espuma. Assim sendo estes resultados podem ser explicados pelo nível de IBUs da cerveja de controlo ao longo do tempo (gráfico da Figura 24), porque os iso- $\alpha$ -ácidos (responsáveis pela a maior parte do amargor da cerveja) têm uma favorável influência na estabilidade da espuma (Bamforth C. & Kanauchi M., 2003).



**Figura 24** Avaliação da estabilidade da espuma ao longo do tempo de prateleira das cervejas.

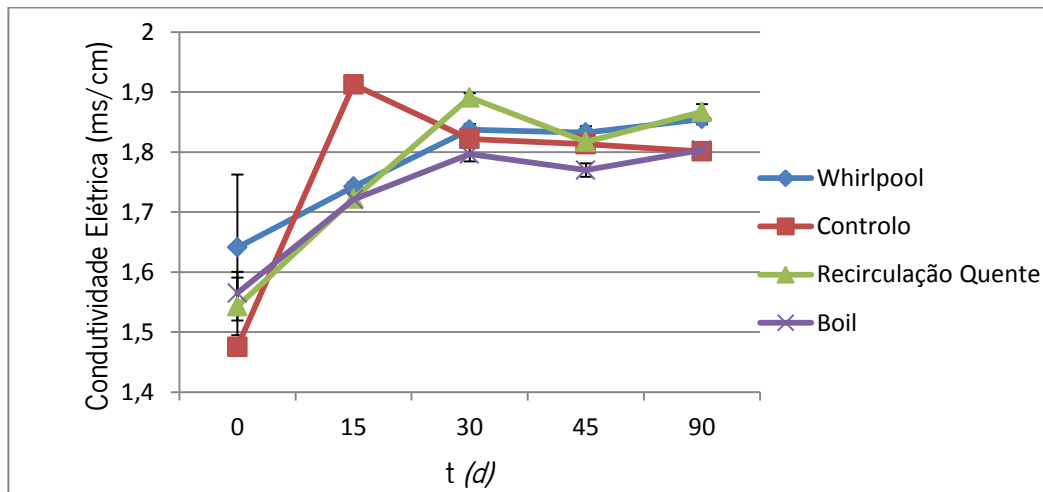
Ao longo do tempo de armazenamento das cervejas esperava-se que a estabilidade da espuma diminuísse, isso aconteceu na generalidade das cervejas ao longo do tempo, porque algumas destas garrafas de cerveja poderiam ter maiores concentrações residuais de levedura do que outras e quanto maior a concentração de levedura presente numa cerveja implica uma diminuição da estabilidade da espuma. Assim sendo, os dias em que se verifica um aumento da estabilidade da espuma nas cervejas *Whirlpool*, *Recirculação Quente* e *Controlo* pode ser justificado pela existência de menores concentrações de levedura nas amostras de cerveja analisadas nestes tempos (Eßlinger H., 2009).

Além disso o aumento da estabilidade da espuma das cervejas *Whirlpool*, *Controlo* e *Recirculação Quente* também podem ser justificados pelo aumento do pH no dia 90 verificado na Figura 23 (Bamforth C. & Kanauchi M., 2003).

Outro parâmetro que pode influenciar a estabilidade da espuma é a temperatura de armazenamento das cervejas (temperaturas entre 19 °C e 22,5 °C), pois temperaturas de armazenamento iguais ou superiores a 2 °C influenciam negativamente este parâmetro (Eßlinger H., 2009).

#### 4.3.4 Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica foi um parâmetro que também se pretendeu avaliar neste ensaio como mostra a Figura 25, e revela a força iónica numa solução, tal como a concentração de sais minerais e mobilidade dos iões. Em geral, a condutividade elétrica na cerveja costuma apresentar-se entre 1,2 mS/cm e 2,3 mS/cm, e aumenta consoante a temperatura (“www.Hyfoma.com,”; Zhang H., 2007).



**Figura 25** Análise da condutividade elétrica ao longo do tempo de prateleira das cervejas.

Observando a Figura 25 constatou-se que as cervejas estão dentro dos valores da condutividade para o geral das cervejas de acordo com a literatura. Verificou-se ainda que existiu um aumento de condutividade elétrica das cervejas durante os primeiros 30 dias de armazenamento, por sua vez no resto do ensaio os valores deste parâmetro mantiveram-se relativamente constantes.

#### 4.3.5 FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

A atividade antioxidante das cervejas foi analisada pelo método FRAP no tempo inicial e final de armazenamento das cervejas ( $t_i$  e  $t_f$ ) (Figura 26). Como já foi referido anteriormente as cervejas contêm propriedades antioxidantes que previnem o envelhecimento das propriedades organoléticas ou deterioração destas. Contudo as temperaturas de armazenamento das cervejas podem contribuir para a diminuição das propriedades antioxidantes (He G. *et al.*, 2012).

O conteúdo de polifenóis de baixo peso molecular nas cervejas também pode influenciar a diminuição de *hazes* e aumentar o poder antioxidante (Almaguer C. *et al.*, 2014).

Visualizando os resultados relativos ao poder antioxidante das cervejas o gráfico da Figura 26 observa-se que o poder antioxidante das cervejas aumentou com o tempo de prateleira da cerveja.

Segundo o estudo efetuado por He *et al* (2012), as cervejas armazenadas a temperaturas superiores a 5 °C influenciam numa diminuição do poder antioxidante das cervejas (He G. *et al.*, 2012).

Uma vez que as temperaturas de armazenamento das cervejas deste experimento foram entre 19 °C e 22,5 °C, seria de esperar que a atividade antioxidante destas diminuísse, o que não aconteceu como pode ser observado na Figura 26. Apesar destes resultados não irem de acordo com o esperado, tal acontecimento pode ser justificável para as todas as cervejas menos a de Controlo, porque a remoção do *trub* nestas cervejas não foi tão eficiente, assim sendo estas poderiam ter um maior conteúdo de polifenóis de baixo peso molecular que se foram dissolvendo ao longo do tempo de prateleira (Almaguer C. *et al.*, 2014).

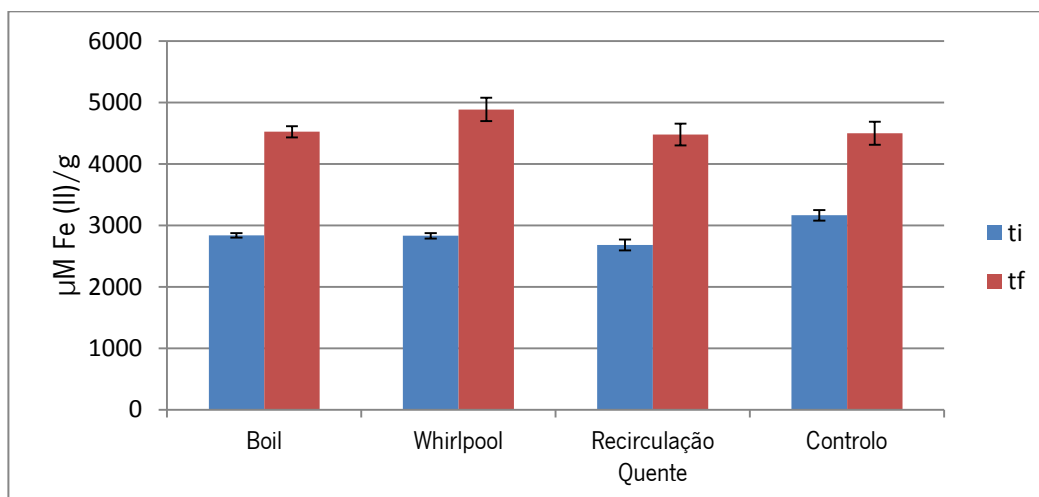


Figura 26 Análise do poder antioxidante das cervejas em ti e tf.

Relativamente ao poder antioxidante obtido em cada cerveja pode observar-se que a cerveja Controlo em ti e a cerveja *Whirlpool* em tf apresentam os melhores resultados em termos de poder antioxidante. Consoante os resultados obtidos e as técnicas de lupulização utilizadas, o *whirlpool hopping* é a técnica que confere melhores propriedades antioxidantes.

Devido ao aumento da atividade antioxidante das cervejas em tf, sugere-se que se repita o ensaio, porque pode ter havido erros na realização deste teste em tf ou em ti.

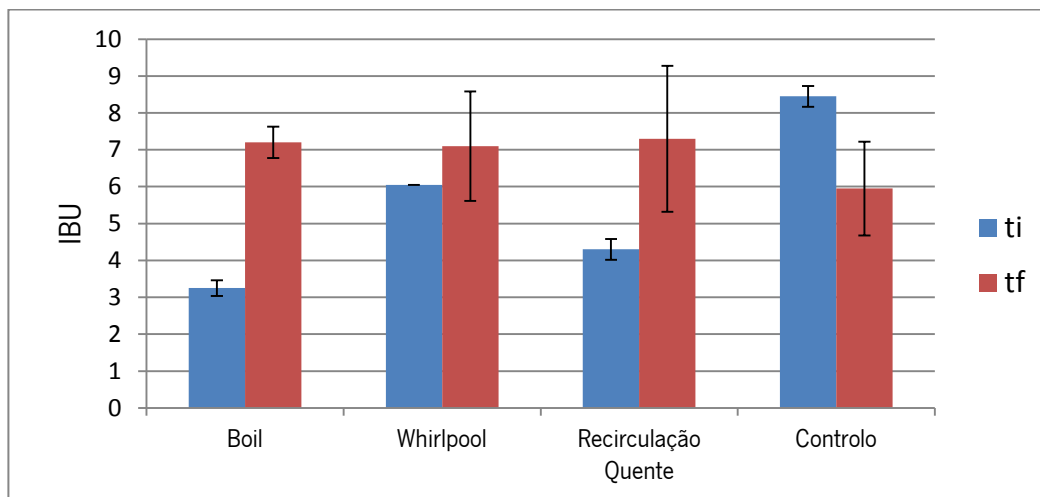
#### 4.3.6 IBUs (Amargor)

De seguida realizou-se a análise de IBUs nas cervejas, onde se optou por fazer somente dois ensaios no tempo inicial e final do tempo de prateleira (ti e tf) em duplicado, como mostra a Figura 27.

Na Figura 27 é possível identificar variadas diferenças no que diz respeito a este parâmetro, por exemplo: verifica-se que em ti a cerveja de controlo contém mais amargor que as restantes



cervejas, enquanto que em *tf* a situação inverte-se, sendo a cerveja de controlo com valores de IBUs mais baixos. Apesar de ter sido adicionado à cerveja de controlo lúpulo numa quantidade inferior às restantes cervejas, verifica-se que esta cerveja tem mais amargor, o que pode ser justificável por ter sido feita a adição do lúpulo *Saaz* a meio da ebulição do mosto. Nas restantes cervejas as técnicas de lupulização utilizadas são consideradas *late hopping*. Como já foi referido anteriormente, maior parte do amargor presente na cerveja é proveniente do iso- $\alpha$ -ácidos formados durante a ebulição do mosto por reações de isomerização, por sua vez estes ácidos podem sofrer degradações por reações de oxidação, o que pode explicar o decréscimo de iso- $\alpha$ -ácidos e consequente nível de amargor na cerveja de controlo ao final de 90 dias de armazenamento (Jaskula B. *et al.*, 2010).



**Figura 27** Avaliação de amargor nas cervejas em *ti* e *tf*.

Quanto às cervejas *Boil*, *Whirlpool* e *Recirculação Quente* analisando a mesma figura pode-se verificar que os valores de IBUs destas cervejas em *tf* foi maior comparativamente com os valores obtidos em *ti*. Estes resultados não eram esperados, visto que a maior parte das substâncias que conferem amargor são os iso- $\alpha$ -ácidos, e estes têm tendência a degradar-se por via oxidativa ao longo do tempo, ao contrário do que se pode visualizar nesta análise. Dois factores muito importantes que podem influenciar a degradação dos iso- $\alpha$ -ácidos são as temperaturas de armazenamento das cervejas e a exposição a alguma luz. As temperaturas de armazenamento neste ensaio foram compreendidas entre 19 °C e 22,5 °C, o que poderiam ter justificado a degradação destes ácidos, fazendo com que houvesse uma diminuição ligeira dos isómeros trans-iso- $\alpha$ -ácidos, o que já não aconteceria com os isómeros cis-iso- $\alpha$ -ácidos que se manteriam constantes, de acordo com o artigo *Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage*.(Caballero I. *et al.*, 2012).

Relativamente à fotodegradação, esta consiste na degradação dos iso- $\alpha$ -ácidos por exposição à luz afetando o sabor da cerveja dando origem ao *lightstruck flavor*, este aspeto é facilmente detetável no odor e sabor da cerveja. Para minimizar tal acontecimento é necessário armazenar as cervejas em garrafas que não sejam transparentes à luz UV (Ultravioleta), como por exemplo garrafas castanhas. As garrafas utilizadas neste experimento foram desta cor, por isso diminuiu-se a possibilidade de fotodegradação (Caballero I. *et al.*, 2012)

Observando a Figura 27 é possível aferir que os erros associados às amostras em  $t_f$  são muito superiores aos erros relativos às amostras em  $t_i$ . Assim sendo é compreensível que algumas das amostras em  $t_f$  tenham mais amargor que as respetivas amostras em  $t_i$ .

Em relação à cerveja de controlo observa-se que esta perdeu amargor ao longo do tempo de prateleira, o que mostra ser um resultado coerente, conforme as explicações da degradação dos iso- $\alpha$ -ácidos ao longo do armazenamento acima referidas.

O aumento de amargor nas cervejas *Boil*, *Whirlpool* e Recirculação Quente de  $t_i$  até  $t_f$  podem também ser explicados pela dificuldade de uma eficiência tão boa como a da cerveja de Controlo na remoção do trub, realizadas na produção destas três cervejas.

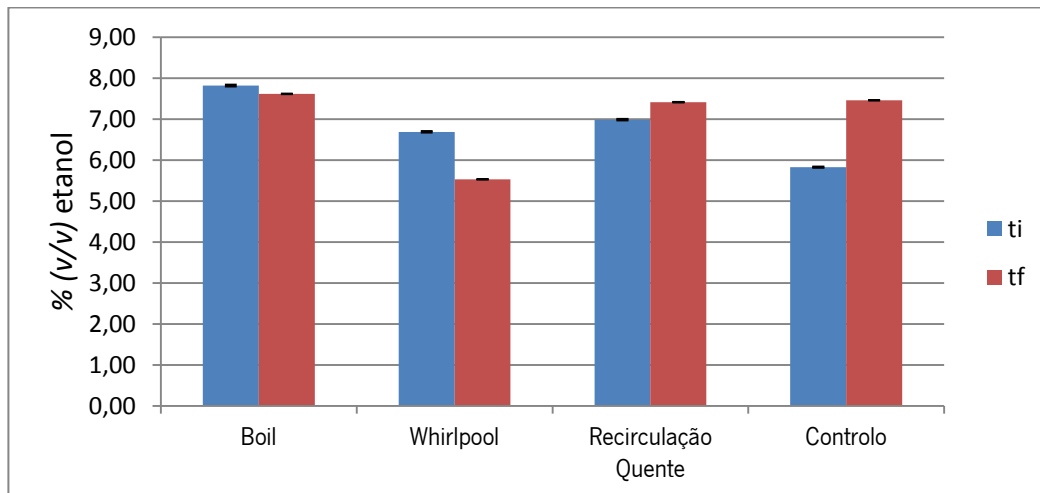
#### 4.3.7 Análise do etanol ao longo do tempo de prateleira

A análise por HPLC permite identificar e quantificar alguns dos compostos maioritários das amostras de cerveja. Neste caso de estudo foi utilizada para identificar e quantificar o etanol, sendo este composto um subproduto da etapa de fermentação primária da cerveja, como já foi referido no Capítulo 2 e pode-se observar na Figura 28 o teor alcoólico de cada uma das cervejas relativas a este ensaio.

Na cerveja a formação do etanol é proveniente da fermentação primária realizada por via metabólica da levedura, em condições anaeróbias a partir dos hidrocarbonetos presentes no mosto. Além da formação do etanol durante esta etapa, também existe a formação de  $CO_2$ . A análise do etanol por HPLC foi um aspeto importante para este ensaio, porque este composto é o álcool presente em maior quantidade no geral das cervejas, com concentrações de entre 20 g/L e 80 g/L (2,54 % e 10,14 % de etanol). Além disso, o etanol contribui diretamente para o sabor e aroma da cerveja. O segundo álcool que apresenta maiores valores de concentração é o glicerol (aparece com concentrações entre 12 g/L e 20 g/L nas cervejas), que não foi analisado por não revelar grande importância para este estudo (Baxter E. *and* Hughes P., 2001; EBlinger H., 2009).

Como se pode verificar na Figura 28 no tempo inicial a cerveja de controlo tem uma percentagem de etanol inferior às restantes cervejas, que pode ser explicada pela ausência da técnica

*priming* comparativamente com as restantes. Visto que a cerveja de controlo já continha gás dissolvido no momento de engarrafamento, não foi necessário realizar esta técnica. Esta que consistiu na adição de açúcar à garrafa, com concentração de 4 g/L, para que se pudesse realizar a refermentação em garrafa e consequentemente a formação de CO<sub>2</sub> e etanol. Como as garrafas estão fechadas haverá um aumento de pressão na garrafa e uma parte do gás irá dissolver-se na cerveja (Baxter E. and Hughes P., 2001).



**Figura 28** Teor alcoólico volumétrico das cervejas em ti e tf.

Ainda em ti as cervejas *Whirlpool* e Recirculação Quente contêm menos percentagem de etanol do que a cerveja *Boil*, e contêm 7 % e 8 % de etanol respetivamente.

No final do armazenamento das cervejas em tf, realizou-se o mesmo ensaio à percentagem de etanol para cada cerveja e constatou-se que na cerveja *Boil* a concentração de etanol manteve-se constante. Na cerveja *Whirlpool* houve um decréscimo da percentagem de etanol, em que a justificação mais plausível é que se deveu a erros experimentais da análise por HPLC, por isso sugere-se que se repita este ensaio. A justificação menos provável indica que estes decréscimos de concentração de etanol durante o tempo de prateleira destas cervejas, foi devido a possíveis oxidações do etanol em acetaldeído pela reação de Fenton (mecanismo de radicais livres). A formação do acetaldeído pode estar relacionada com as temperaturas a que as garrafas estiveram armazenadas. Segundo um estudo efetuado por Šmogrovičová D. *et al.*, quanto maior for a temperatura de armazenamento e a presença de oxigénio, maior será a concentração de acetaldeído e diacetil. Nas restantes cervejas verificou-se um aumento da concentração de etanol, o que é justificável pela possível refermentação em garrafa (Baert J. *et al.*, 2012; Šmogrovičová D. *et al.*, 2011).

O teor de etanol das cervejas Controlo e Recirculação Quente aumento ao longo do tempo de prateleira, o que é um indicio de que existiu refermentações em garrafa, ao que se deve essencialmente às temperaturas de armazenamento aplicadas.

#### 4.3.8 Análise de compostos voláteis

A análise por GC-MS das cervejas produzidas do linalol e do  $\alpha$ -terpineol foi feita no tempo inicial e final (ti e tf), para observar as diferentes variações destes dois compostos aromáticos ao longo do tempo de prateleira das cervejas, como se pode observar na Figura 29.

O maior impacto da primeira visualização da Figura 29 foi a inexistência do  $\alpha$ -terpineol em todas as cervejas no tempo final do ensaio (tf). Acerca desta característica nas cervejas finais, pode-se então concluir que o  $\alpha$ -terpineol degradou-se por reações oxidativas que podem ter sido propiciadas pela ação da temperatura.

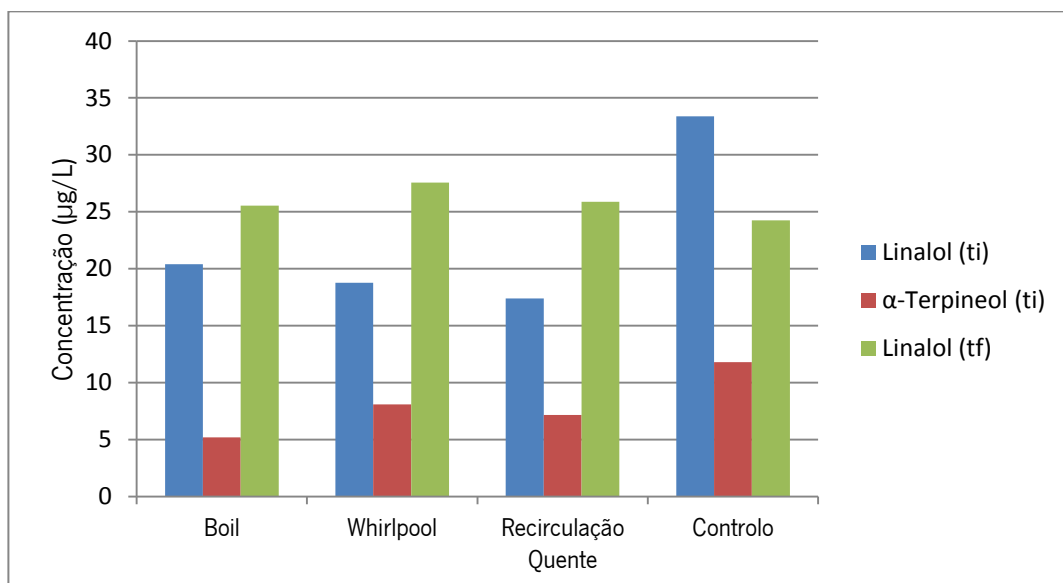


Figura 29 Concentração do linalol e do  $\alpha$ -terpineol nas cervejas em ti e tf.

No entanto é possível observar que o  $\alpha$ -terpineol no tempo inicial (ti) aparece em maior quantidade na cerveja de controlo comparativamente com as restantes cervejas. As restantes cervejas apresentam concentrações semelhantes de  $\alpha$ -terpineol no tempo inicial.

Como seria de esperar, o linalol encontra-se em todas as cervejas deste ensaio em concentrações superiores às do  $\alpha$ -terpineol, porque é o indicador mais adequado de sabor/aroma lupulado das cervejas que principalmente são realizadas a partir de técnicas de *late hopping*, como aconteceu nas cervejas produzidas (Hanke S., 2009).

Observando a Figura 29, verifica-se que a cerveja de controlo é a que apresenta maior concentração de linalol em  $t_i$  em relação às restantes. Este resultado é aceitável, pois adicionou-se lúpulo por *late hopping* para conferir aroma a cerveja a uma concentração superior às restantes cervejas produzidas. Além da adição do lúpulo por *late hopping* também foi adicionado mais lúpulo a meio da etapa de ebulição do mosto com uma concentração de 1 g/L (*middle hopping*), o que também pode ter contribuído para o aroma a lúpulo na cerveja. Como já foi referido anteriormente por várias vezes, a concentração de lúpulo as restantes cervejas foi de 2 g/L.

Em relação às restantes cervejas em  $t_i$ , esperava-se que a cerveja Whirlpool e Recirculação quente, tivessem concentrações de linalol superiores á cerveja *Boil*, o que não aconteceu. (Hanke S., 2009).

A cerveja de controlo no tempo final ( $t_f$ ), obteve uma concentração de linalol inferior bem significativa relativamente ao tempo inicial ( $t_i$ ), o que se explica por reações de oxidação derivadas da temperatura de armazenamento das garrafas de cerveja.

Analisando as restantes cervejas em  $t_f$ , observa-se que estas apresentam valores de concentrações de linalol superiores do que em  $t_i$ . Estas ascensões da concentração do linalol nestas cervejas podem ser justificadas por refermentações, visto que o linalol é originado por biotransformações sobre a ação leveduras (Takoi K. *et al.*, 2010).

#### 4.3.9 Análise Sensorial

Além das avaliações físico-químicas das cervejas, também se considerou importante analisar estas ao nível sensorial. A análise sensorial permitiu então avaliar as cervejas em termos de aparência, aroma, sabor, sensação e qualidade, e observar se existiram variações ao longo do tempo de prateleira foram, possam ter sido causadas por oxidação ou por outros fatores (Heuberger A. *et al.*, 2012).

É necessário entender que a qualidade do sabor/aroma (*flavor*) é um aspeto importante para a maioria dos apreciadores e consumidores de cerveja. Assim sendo é indispensável que o sabor/aroma tenha uma boa qualidade, sem poder escapar muito à estabilidade do sabor/aroma a que grande parte dos consumidores está acostumada (Baert J. *et al.*, 2012).

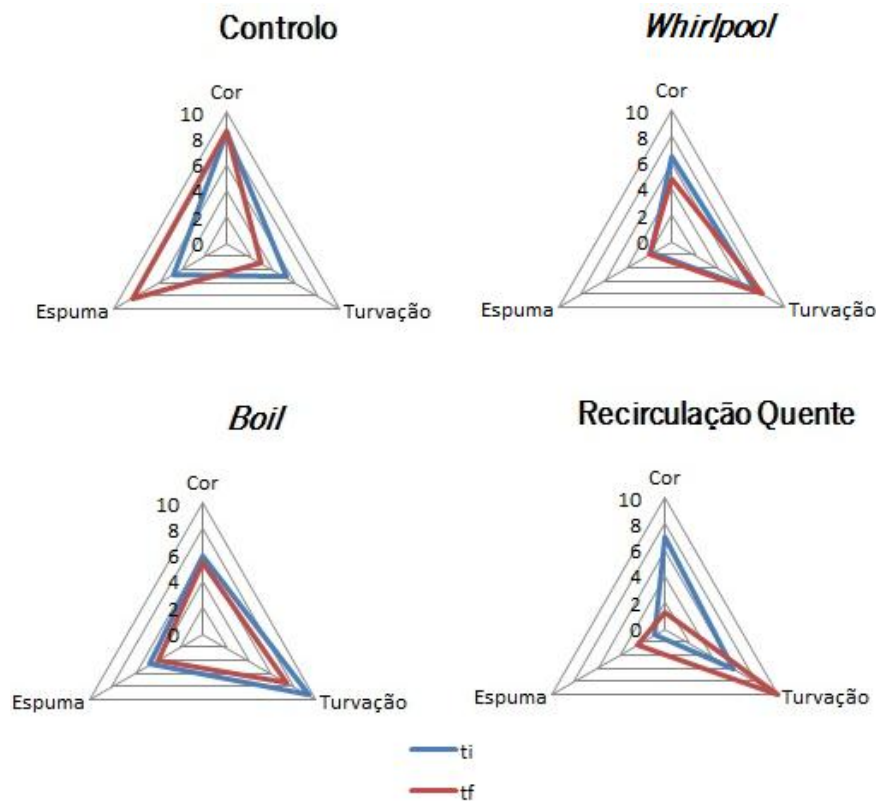
No final da avaliação das características sensoriais das cervejas foram identificados e calculados *outliers* de forma a excluir avaliações extremas ou desviadas.

##### 4.3.9.1 Aparência

As características visuais que se pretenderam avaliar na aparência das cervejas foram a cor, a espuma e a turvação, tal como mostra Figura 30.

Relativamente à cor das cervejas observa-se que a cerveja do controlo apresenta melhor cor, não se alterando ao longo do tempo de prateleira. Nas cervejas Recirculação Quente e *Whirlpool* foram visíveis decréscimos na qualidade da cor, maioritariamente na cerveja de Recirculação Quente. Quanto à cerveja *Boil* a qualidade da cor manteve-se constante ao longo do tempo de armazenamento.

A qualidade da espuma é um aspeto da aparência da cerveja que já tinha sido avaliada pelo método de *Rudin* (método físico-químico), de forma a determinar a sua estabilidade. Os resultados por essa análise estão de acordo com os resultados obtidos sensorialmente. Assim sendo ao longo do tempo houve variações na qualidade da espuma, sendo a que apresenta melhor qualidade é sem dúvida alguma a cerveja de controlo, seguida da cerveja *Boil*, Recirculação Quente e *Whirlpool*, sucessivamente. Todas as cervejas menos a de *Whirlpool* apresentam degradações em termos de qualidade da espuma, o que pode revelar deteriorações devido às temperaturas de armazenamento nas cervejas.



**Figura 30** Gráficos sensoriais relativos à aparência de cada cerveja em ti e tf.

Observando a turvação das cervejas, verifica-se que a cerveja de controlo no final do armazenamento é a menos turva, no entanto a cerveja de Recirculação Quente apresenta-se demasiado turva. A elevada turbidez nesta última cerveja pode ser explicada por formações de precipitados por causa das temperaturas de armazenamento e também por causa da levedura residual existente nas garrafas (Priest, F. and Stewart G., 2006).

Conclui-se então que a cerveja que apresenta melhores características visuais é a de controlo, em que se observa degradação na qualidade da espuma, melhoria ao nível da turvação e estabilização na cor. Em contrapartida a cerveja de recirculação quente é a que se identifica como a pior em termos de aparência, uma vez que se visualiza uma degradação em todas as características.

#### 4.3.9.2 Aroma (odor)

O aroma da cerveja é influenciado por vários compostos presentes na cerveja, por isso a avaliação do aroma é bastante difícil e complexa. É realmente importante perceber que a análise do aroma não se dedica só a cheirar a cerveja, mas também a bebê-la por causa dos compostos voláteis que se libertam na boca e caminham em direcção a via retronasal. Esta via é a que faz ligação entre a boca, garganta e vias nasais (Baxter E. *and* Hughes P., 2001).

No gráfico de perfis sensoriais da Figura 31 estão representados os perfis aromáticos presentes na para as cervejas no tempo inicial e final do ensaio. Para a realização destes perfis sensoriais aromáticos, decidiu-se escolher determinadas características aromáticas consoante este tipo de cervejas (*Pilsner*), que foram os aromas: frutado, solvente, papel/cartolina, frutos vermelhos, caramelizado, sulfuroso e floral (lúpulo).

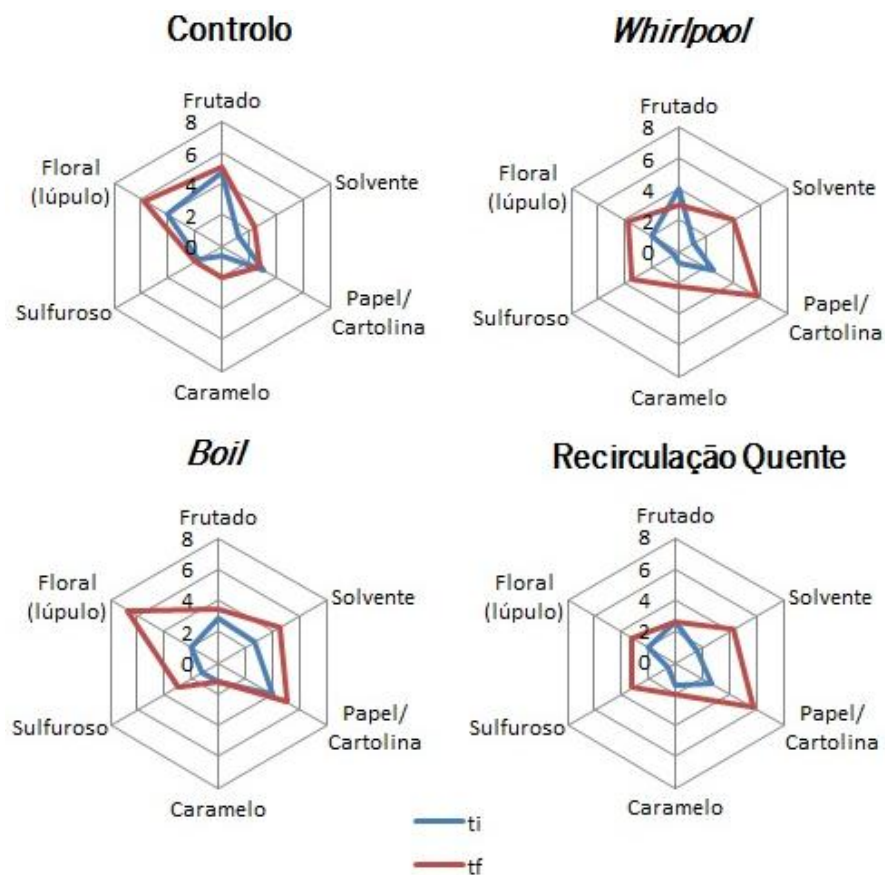


Figura 31 Gráficos sensoriais relativos ao aroma de cada cerveja em ti e tf.

Analisando os gráficos dos perfis aromáticos da Figura 31 verifica-se que na generalidade existiram aumentos de todos os indicadores aromáticos em todas as cervejas ao longo do tempo de prateleira.

Quanto ao aroma frutado e floral são os aromas mais significativos para este estilo de cerveja (*Pilsner*), logo as cervejas de controlo e de *Boil* foram as que se identificaram mais com este tipo de cerveja, porque foram nestas que se conseguiram uma melhor perceção destes aromas.

Relativamente ao aroma a cartolina verificou-se um aumento em todas as cervejas exceto na cerveja de controlo. Sendo que a perceção deste aroma é considerado um indicador de oxidação da cerveja, logo as cervejas referidas foram alvos de oxidação (Priest, F. and Stewart G., 2006).

Verificou-se também um aumento quanto ao aroma a solvente no geral das cervejas, pode indicar um aumento de ésteres ou outros álcoois (como o metanol). Estes compostos são sintetizados pela levedura presente na cerveja, logo indicam que existiu atividade da levedura durante o armazenamento da cerveja (Baxter E. and Hughes P., 2001).

Quanto ao aroma sulfuroso as cervejas Whirlpool e Recirculação Quente foram as que se conseguiram notar mais este tipo de aroma. Este aroma está relacionado com os compostos que contêm enxofre, em que nas cervejas *lager* o composto maioritário presente costuma ser DMS. Este composto pode ser originado durante o tempo de prateleira a partir da redução do DMSO (dimetilsulfóxido) por ação da levedura. Por sua vez, a origem do composto DMSO tal como o nome indica é o DMS oxidado. Quanto ao DMS é formado a partir da degradação da SMN (S-metilmetionina), este que é originado durante a proteólise que acontece durante a maltagem do cereal. Em algumas cervejas do tipo *lager* europeias a perceção de níveis mais elevados de DMS são mais aceitáveis. Por esta razão a perceção de aroma a sulfuroso não é propriamente desagradável nem inconveniente, mas obviamente que em níveis exagerados acaba por ser (Briggs D. *et al.*, 1999; Baxter E. and Hughes P., 2001).

Consoante a perceção do aroma sulfuroso nas cervejas, considera-se que as cervejas *Boil*, *Whirlpool* e Recirculação Quente contêm uma concentração de levedura residual em cada garrafa maior do que a de controlo.

#### 4.3.9.3 Sabor

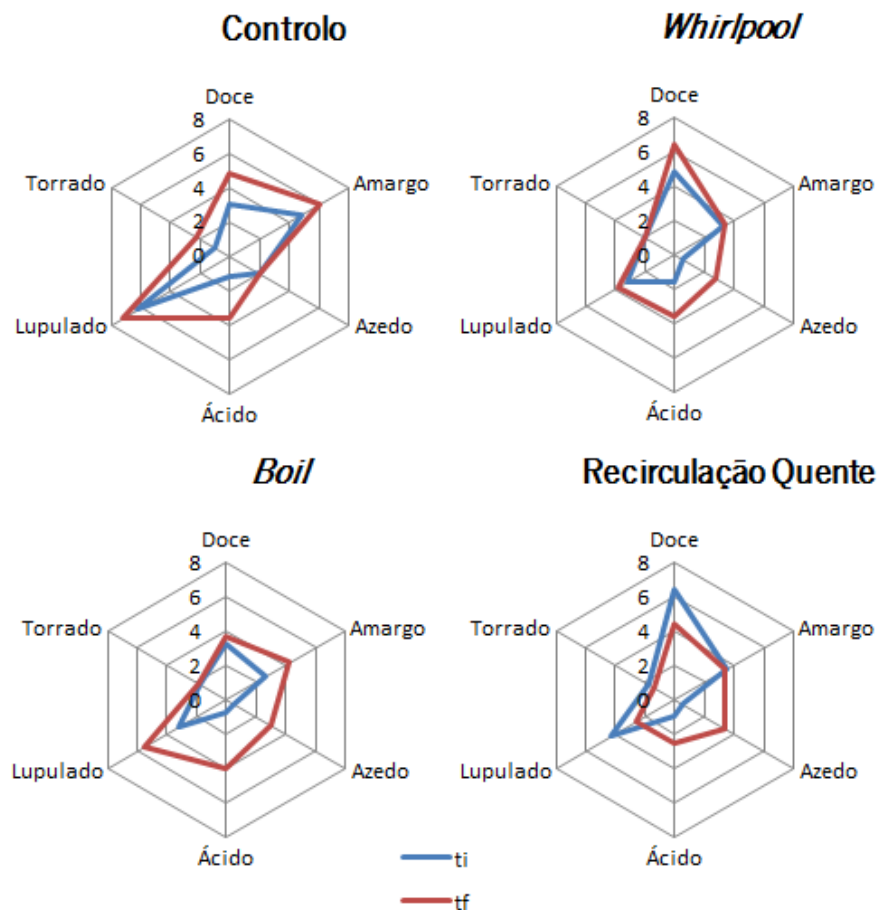
Com a análise dos gráficos de perfis de sabores da Figura 32, observou-se variações dos diferentes sabores ao longo do tempo de prateleira das cervejas. Os cinco principais sabores que se conseguem compreender e distinguir pelos recetores na superfície da língua são o doce, o amargo, o



salgado, o azedo e o umami. Destes sabores só três deles foram avaliados, juntamente com os sabores torrado, lupulado e ácido (Baxter E. *and* Hughes P., 2001).

A cerveja de controlo foi a que apresentou ter um sabor mais amargo e a lúpulo comparativamente com as restantes. Em geral, com o armazenamento das cervejas verificou-se um aumento de acidez/azedume, enquanto que o sabor tostado permaneceu constante. Os sabores mais notáveis na cerveja foram o doce, o amargo e a lúpulo.

O aumento da acidez/azedume em todas as cervejas ao longo do tempo de prateleira podem estar relacionados com os ácidos orgânicos, que são subprodutos criados pelas leveduras durante a fermentação. Assim sendo estas características são indicadoras de refermentações em garrafa (Baxter E. *and* Hughes P., 2001).



**Figura 32** Gráficos sensoriais relativos ao sabor de cada cerveja em *ti* e *tf*.

A perceção do sabor amargo e lupulado aumenta em todas as cervejas no tempo final de avaliação exceto a de Recirculação Quente. O resultado desta cerveja e da cerveja de controlo não estão de acordo com a análise química efetuada aos IBUs (unidade internacional de amargor).

Verifica-se uma perceção melhor do lúpulo nas cervejas *Boil* e *Controlo*, o que indica que estas cervejas apresentam um sabor melhor do que as outras.

#### 4.3.9.4 Sensação (*mouthfeel*)

A sensação na boca de um alimento ou de uma bebida, é um parâmetro de difícil avaliação e definição, porque ainda hoje é um caso de estudo onde se tenta descrever o que é realmente este parâmetro. A sensação na boca está envolvida muito mais com a textura do que o sabor do alimento (Baxter E. *and* Hughes P., 2001).

Na Figura 33 visualiza-se as características que se escolheram para avaliar a sensação na boca foram: a carbonatação, o corpo, a adstringência e o quente. Além destas poder-se-ia ainda avaliar outras características deste parâmetro, como por exemplo: *mouthcoating*, alcalinidade, powdery (Baxter E. *and* Hughes P., 2001).

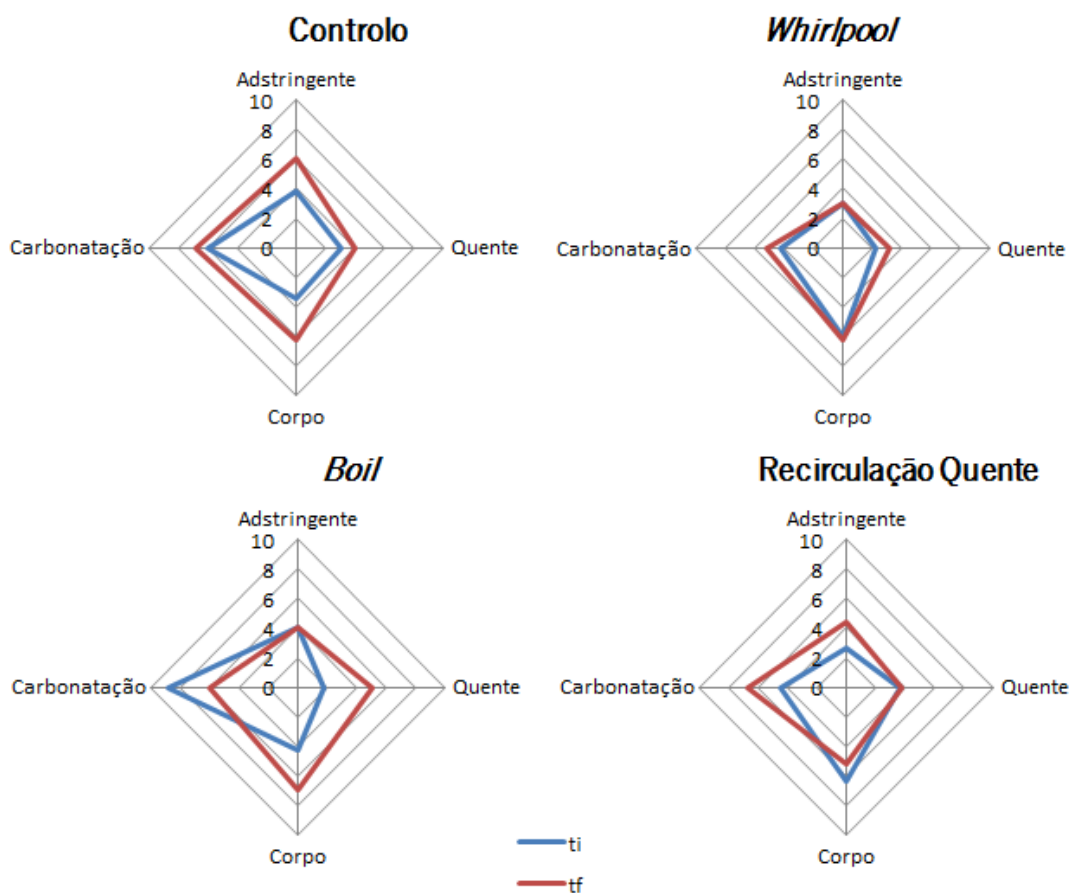


Figura 33 Gráficos sensoriais relativos à sensação de cada cerveja em ti e tf.

Em geral todas as cervejas sofreram um aumento das características da sensação na boca, exceto a carbonatação da cerveja *Boil* e o corpo da cerveja Recirculação Quente, que decresceram.

A sensação quente na boca é vista como a percepção de etanol, esta que teve um aumento considerável na cerveja *Boil*, o que pode indicar que provavelmente ocorreu refermentação em garrafa.

A sensação de adstringente não é considerada uma boa sensação visto que não é uma sensação boa, principalmente em exagero.

#### 4.3.9.5 Qualidade geral

A avaliação da qualidade geral das cervejas foi dividida em qualidade: visual, aromática, de sabor e de sensação na boca, como se pode verificar nos gráficos sensoriais presentes na Figura 34.

Observando os respetivos gráficos dos perfis de qualidade, confirma-se que a cerveja de controlo foi a que adquiriu melhor qualidade geral tanto no tempo inicial (ti) e final (tf). A cerveja *Boil* melhorou ao longo do tempo de prateleira, visto que no início do ensaio esta apresentou a pior qualidade e no final foi a segunda melhor. Em relação às duas cervejas restantes, verificou-se uma diminuição geral ao longo do armazenamento das cervejas, em que na Recirculação Quente existiu uma diminuição bem considerável.

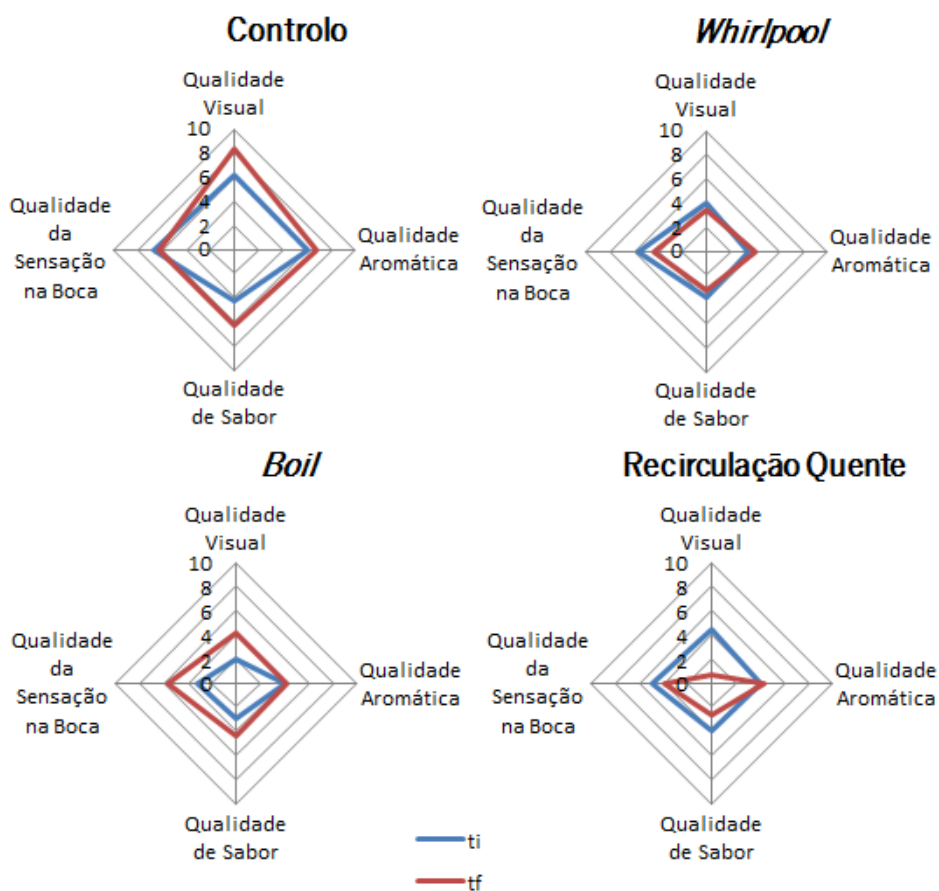


Figura 34 Gráficos sensoriais relativos às qualidades gerais de cada cerveja em ti e tf.

Pode-se concluir que a técnica de adição de lúpulo no final da etapa de ebulição do mosto, apresenta melhores resultados na estabilidade da cerveja, do que as técnicas de *whirlpool hopping* e *hop back*.

#### 4.3.9.6 Qualidade Global

Com a avaliação da qualidade global destas cervejas no início e no final (ti e tf) ao longo do tempo de prateleira Figura 35, pode-se perceber um pouco mais de quais as melhores técnicas de lupulização a utilizar na produção de cerveja para obter uma melhor qualidade.

A cerveja Controlo foi a que obteve melhor qualidade, o que pode indicar que é mais favorável utilizar mais de que uma técnica de lupulização na produção de uma cerveja.

Analisando o gráfico da Figura 35 conclui-se que a adição de lúpulo no final da etapa de ebulição, confere uma melhor qualidade global ao longo do tempo de prateleira do que a adição de lúpulo feita por *hop back*. Pode-se retirar esta conclusão, visto que a qualidade das cervejas Recirculação Quente e Whirlpool foi inferior no tempo final de armazenamento. A avaliação global das cervejas vai de acordo com a qualidade geral destas, como foi observado anteriormente.

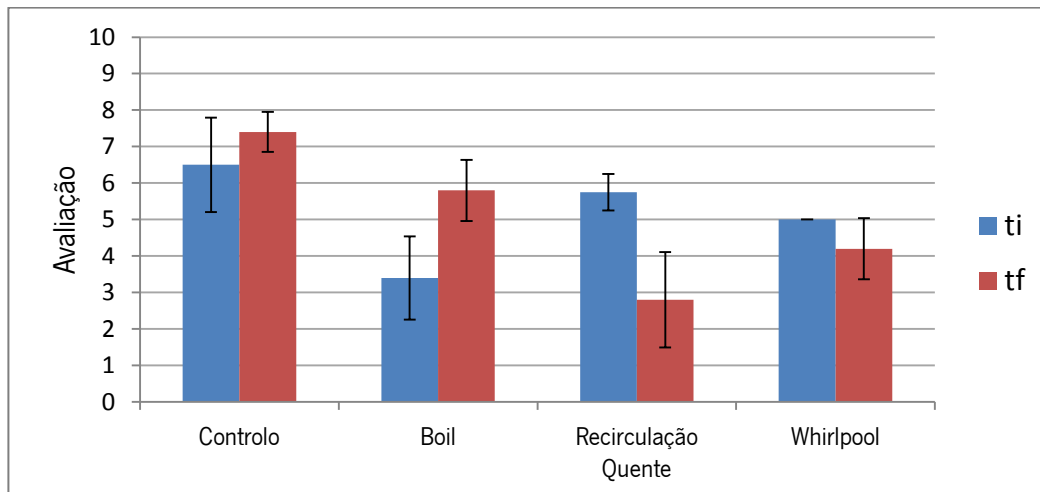


Figura 35 Qualidade global das cervejas em ti e tf.

Relativamente à adição de lúpulo na etapa de Whirlpool não se pode concluir concretamente referente à estabilidade da qualidade global devido aos erros demonstrados. Mesmo assim verifica-se que tanto manteve a qualidade global ou decresceu nela.

Consoante os erros demonstrados pela análise sensorial sugere-se que se repita os ensaios, se faça várias análises sensoriais e com equipas de provadores mais treinadas para este tipo de análises.

## 5 Conclusões e sugestões de trabalho futuro

A escolha das três técnicas de lupulização escolhidas foram baseadas tendo em conta várias observações das extrações aquosas realizadas, de seguida refere-se quais as técnicas escolhidas e a causa dessas escolhas. A recirculação quente (*hop back*), porque não demonstrou turvação nem indícios de contaminação como as extrações aquosas Recirculação Fria e *Dry Hopping*. Estas 3 extrações aquosas só foram realizadas mas não analisadas quimicamente;

A adição do lúpulo no fim da ebulição do mosto (*Boil F*) foi selecionada devido aos bons resultados das análises em termos de aroma a lúpulo (linalol) e poder antioxidante. Relativamente à característica de amargor, a análise de IBU foi contraditória relativamente à sensorial, o que suscitou também algum interesse;

A escolha do *whirlpool hopping* foi baseada no resultado da análise sensorial, onde se verificou que a extração Whirlpool foi a que apresentou melhor aroma. Além disso o *whirlpool hopping* é uma técnica análoga à recirculação quente.

Consoante as técnicas escolhidas as cervejas foram então produzidas utilizando uma concentração de 2 g/L de lúpulo *Saaz*, com a finalidade de avaliar a estabilidade destas ao longo tempo de prateleira por ação de avaliações químicas e sensoriais. Além das cervejas produzidas também se avaliou a cerveja de Controlo (cerveja do tipo *Pilsner* do Lote de produção), esta que serviu de comparação em relação às restantes cervejas escolhidas.

Relativamente aos resultados obtidos neste estudo, podem-se retirar algumas conclusões. As temperaturas elevadas a que foram submetidas as 3 cervejas produzidas durante a etapa de fermentação primária, conduziram a fermentações rápidas (3 dias).

Comprovou-se também que as temperaturas de armazenamento elevadas (entre 22,5 °C e 19 °C) das cervejas influenciam negativamente a estabilidade da cerveja ao longo do tempo de prateleira, como por exemplo: refermentações da cerveja em garrafa, diminuição do pH, diminuição da estabilidade da espuma, IBU (unidade internacional de amargor), maior concentração de etanol, alteração da concentração de compostos aromáticos importantes e alterações ao nível sensorial.

As refermentações ocorridas por ação da levedura, originam ácidos orgânicos como o acético, láctico, entre outros que influenciam um decréscimo do pH na cerveja. Além disso as refermentações também originam maior concentração de etanol e CO<sub>2</sub> nas cervejas.

Relativamente à análise de IBUs concluiu-se que o decréscimo deste parâmetro ao longo tempo de prateleira na cerveja de Controlo é causado pela temperatura de armazenamento que influencia mais ainda a oxidação dos iso- $\alpha$ -ácidos. Quanto às restantes cervejas em que se verificou um

aumento de IBUs ao longo do tempo de prateleira das cervejas pode-se concluir que a causa está na pior eficiência da remoção do  *trub*.

O poder antioxidante das cervejas também foi medido pelo método FRAP e foi possível observar um aumento ao longo do tempo de prateleira das cervejas. Uma vez que se esperava uma diminuição do poder antioxidante ao longo do tempo devido às temperaturas elevadas de armazenamento, uma hipótese sugerida para esta causa foi a menor eficiência da remoção do  *trub* nas 3 cervejas produzidas, a qual pode ter originado uma maior dissolução dos polifenóis de baixo peso molecular presentes no lúpulo. Assim sendo esta hipótese não está de acordo com o que se passou a com a cerveja de controlo, visto que existiu uma boa eficiência do  *trub* na produção desta cerveja.

Conclui-se que a diminuição de etanol na cerveja Whirlpool ao longo do tempo é causada pela oxidação do etanol em acetaldeído (reação de Fenton), esta que pode ser influenciada por elevadas temperaturas de armazenamento e presença de O<sub>2</sub>. Nas restantes cervejas comprovou-se a refermentação devido às temperaturas de armazenamento elevadas, o que originou uma maior concentração de etanol.

Quanto aos compostos aromáticos, verificou-se a existência de oxidação do  $\alpha$ -terpineol, uma vez que desapareceu em todas as cervejas no tempo final. O melhor indicador de aroma lupulado na cerveja, o linalol, a sua concentração diminuiu na cerveja de Controlo ao longo do tempo devido a reações de oxidação, enquanto que nas restantes cervejas se verificou um aumento. Este aumento verificado é causado por biotransformações que ocorrem por parte da levedura, concluindo-se assim mais uma vez a refermentação das cervejas ao longo do tempo de prateleira.

Concluiu-se que das 4 cervejas analisadas a que obteve melhores resultados de estabilidade ao longo do tempo de prateleira foi a cerveja de controlo, e que das 3 técnicas de lupulização utilizadas na produção de cervejas artesanais, a que obteve melhores resultados de estabilidade nas cervejas ao longo do tempo de prateleira foi a adição de lúpulo no final da ebulição do mosto, neste caso a cerveja *Boil*.

Este trabalho poderá apresentar várias melhorias em aspetos de análise de resultados e em termos de investigação. Com este intuito apresenta-se as seguintes sugestões:

- Sugere-se que se repita o ensaio GC-MS da extração aquosa Whirlpool, o teste FRAP para todas as cervejas e tempos, e o ensaio IBU para as 3 cervejas produzidas. Estas sugestões são baseadas em resultados que não foram de acordo com a literatura;
- A repetição dos ensaios em que os erros nos resultados das análises foram consideravelmente grandes, não podendo por isso tirar uma conclusão exata.



## Referências Bibliográficas

- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T., (2014); *Humulus lupulus – a story that begs to be told. Journal of the Institute of Brewing & Distilling, 120*, 289–314. <http://doi.org/10.1002/jib.160>
- Baert, J. J., De Clippeleer, J., Hughes, P. S., De Cooman, L., & Aerts, G., (2012); On the origin of free and bound staling aldehydes in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60*, 11449–11472. <http://doi.org/10.1021/jf303670z>
- Bamforth, C., (2003); *Beer: tap into the art and science of brewing. Science* (Vol. 315). Retrieved from [http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=-FviAgcmo90C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Beer:+tap+into+the+art+and+science+of+brewing&ots=fOLEpQq3GI&sig=dHP\\_AXyK9F08R8kJ2sx6J02YoDQ](http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=-FviAgcmo90C&oi=fnd&pg=PR9&dq=Beer:+tap+into+the+art+and+science+of+brewing&ots=fOLEpQq3GI&sig=dHP_AXyK9F08R8kJ2sx6J02YoDQ)
- Bamforth, C., & Kanauchi, M., (2003); Interactions between polypeptides derived from barley and other beer components in model foam systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 83*, 1045–1050. <http://doi.org/10.1002/jsfa.1503>
- Barth, R., (2013); *The chemistry of beer : the science in the suds. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). New Jersey, John Wiley & Sons. <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Briggs, D. E., Hough, J. S., Stevens, R., & Young, T. W., (1999); *Malting and Brewing Science: Hopped Wort and Beer* (Second Edi). Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=pt-PT&lr=&id=ciA6-YMTI-UC&pgis=1>
- Bumgarner, M. D. K. and N. R., (2012); Using °Brix as an Indicator of Vegetable Quality, (October).
- Caballero, I., Blanco, C. a., & Porras, M., (2012); Iso- $\alpha$ -acids, bitterness and loss of beer quality during storage. *Trends in Food Science & Technology, 26*(1), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.01.001>
- Clarke, B. J., (1986); HOP PRODUCTS. *Journal of the Institute of Brewing, 92*, 123–130.
- Decker, E. a, Elias, R. J., & McClements, D. J., (2010); *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications* (Vol. 2). Woodhead Publishing Limited.
- E. Denise Baxter and Paul S. Hughes, (2001); *Beer: Quality, Safety and Nutritional Aspects*. UK: The Royal Society of Chemistry. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- EBlinger, H. M., (2009); *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets. Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. <http://doi.org/10.1002/9783527623488>
- Esslinger, H. M. and, & Narziss, L., (2005); Beer. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*.
- European Brewery Convention., (2004); *Analytica-EBC 9.8*. London.



- Faria-oliveira, F., Puga, S., & Ferreira, C., (2013); Yeast : World ' s Finest Chef. *Food Industry*.
- Filip VAN OPSTAELE, Clippeleer, J. De, Praet, T., Bellaio, G., Aerts, G., & Cooman, L. De., (n.d.); Accurate quantitative determination of hop-derived monoterpene alcohols in beer via ion trap tandem mass spectrometry.
- Genisheva, Z., Vilanova, M., Mussatto, S. I., Teixeira, J. a., & Oliveira, J. M., (2014); Consecutive alcoholic fermentations of white grape musts with yeasts immobilized on grape skins – Effect of biocatalyst storage and SO<sub>2</sub> concentration on wine characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 59(2), 1114–1122. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.046>
- Hanke, S., (2009); Linalool – A Key Contributor to Hop Aroma. *MBAA - Global Emerging Issues*, (November).
- He, G., Du, J., Zhang, K., Wei, G., & Wang, W., (2012); Antioxidant capability and potableness of fresh cloudy wheat beer stored at different temperatures. *Journal of the Institute of Brewing*, 118(4), 386–392. <http://doi.org/10.1002/jib.54>
- Heuberger, A. L., Broeckling, C. D., Lewis, M. R., Salazar, L., Bouckaert, P., & Prenni, J. E., (2012); Metabolomic profiling of beer reveals effect of temperature on non-volatile small molecules during short-term storage. *Food Chemistry*, 135(3), 1284–1289. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.048>
- Inui, T., Tsuchiya, F., Ishimaru, M., Oka, K., & Komura, H., (2013); Different beers with different hops. Relevant compounds for their aroma characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 4758–4764. <http://doi.org/10.1021/jf3053737>
- Jaskula-Goiris, B., Aerts, G., & De Cooman, L., (2010); Hop  $\alpha$ -acids isomerisation and utilisation: an experimental review. *Cerevisia*, 35(3), 57–70. <http://doi.org/10.1016/j.cervis.2010.09.004>
- Lermusieau, G., Bulens, M., & Collin, S., (2001); Use of GC-olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3867–3874. <http://doi.org/10.1021/jf0101509>
- Lewis, M. J., & Young, T. W., (2002); *Brewing*. (Kluwer Academic/Plenum Publishers, Ed.) (Second Edi). New York.
- Mignani, A. G., Ciaccheri, L., Mencaglia, A. A., Ottevaere, H., Báca, E. E. S., & Thienpont, H., (2013); Optical measurements and pattern-recognition techniques for identifying the characteristics of beer and distinguishing Belgian beers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 179, 140–149. <http://doi.org/10.1016/j.snb.2012.10.029>
- Moreira, N., Meireles, S., Brandão, T., & De Pinho, P. G., (2013); Optimization of the HS-SPME-GC-IT/MS method using a central composite design for volatile carbonyl compounds determination in beers. *Talanta*, 117(October 2015), 523–531. <http://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.09.027>
- Palmer, J. J., (2001); *How to Brew: Ingredients, Methods, Recipes, and Equipment for Brewing Beer at Home*. Retrieved from <https://books.google.com/books?hl=pt-PT&lr=&id=SYn14ta65EAC&pgis=1>

- Parkin, E. J., (2014); *The Influence of Polyphenols and Humulinones on Bitterness in Dry-Hopped Beer*.
- Peltz, M. L., (2015); *The Role of Alcohol Content on Sensory Aroma Detection Thresholds in Beer*. Oregon State University. Oregon State University.
- Priest, F. G. and Stewart, G. G., (2006); *Handbook of Brewing*.  
<http://doi.org/10.1002/9780470290118>
- Schmidt, C., Hanke, S., & Biendl, M., (n.d.); Studies on hop aroma profile in beer as a function of hop addition time and beer type.
- Schönberger, C., & Kostelecky, T., (2011); 125th Anniversary Review: The Role of Hops in Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 259–267. <http://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>
- Šmogrovičová, D., Bachár, D., & Kováčiková, D., (2011); *Stability of Beer Stored in Different Pet Bottles and Conditions*.
- Solange Mussato, (2010); FERRIC REDUCING ANTIOXIDANT POWER (FRAP) ASSAY. In U. do Minho (Ed.),.
- Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Kosugi, T., Katayama, Y., Nakayama, Y., & Watari, J., (2010); The Contribution of Geraniol Metabolism to the Citrus Flavour of Beer : Synergy of Geraniol and  $\beta$ -Citronellol Under Coexistence with Excess Linalool. *Journal Of The Institute Of Brewing*, 116(3), 251–260. <http://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00428.x>
- Van Opstaele, F., Goiris, K., De Rouck, G., Aerts, G., & De Cooman, L., (2012); Production of novel varietal hop aromas by supercritical fluid extraction of hop pellets - Part 2: Preparation of single variety floral, citrus, and spicy hop oil essences by density programmed supercritical fluid extraction. *Journal of Supercritical Fluids*, 71, 147–161.  
<http://doi.org/10.1016/j.supflu.2012.06.004>
- Wietstock, P. C., Kunz, T., & Methner, F., (2015); Further studies about the effect of the hop dosage on the beer flavour stability. *Technische Universität Berlin, Institute of Food Technology and Food Chemistry, Chair of Brewing Science, Germany*.
- www.academiacervecera.com., (n.d.); Retrieved November 15, 2015, from  
<http://www.academiacervecera.com/blog.php>
- www.barthhaasgroup.com., (n.d.); Retrieved November 15, 2015, from  
<http://www.barthhaasgroup.com/en/varieties-and-products/hop-varieties>
- www.beersmith.com., (n.d.); Retrieved November 13, 2015, from  
<http://beersmith.com/blog/2008/11/11/best-hop-techniques-for-homebrewing/>
- www.cervejaletra.pt., (n.d.); Retrieved November 18, 2015, from  
<http://www.cervejaletra.pt/#abecedario>

www.Hyfoma.com., (n.d.); Retrieved October 23, 2015, from  
[http://www.hyfoma.com/en/content/processing-  
technology/instrumentation/analysis/conductivity/](http://www.hyfoma.com/en/content/processing-technology/instrumentation/analysis/conductivity/)

www.maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt., (2014); Retrieved November 13, 2015, from  
[http://maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt/2014/11/capitulo-16-nuevas-tecnicas-  
de.html](http://maestrosceveceroshispanoparlantes.blogspot.pt/2014/11/capitulo-16-nuevas-tecnicas-de.html)

Zhang, H., (2007); Electrical Properties of Food. *Food Engineering*, 1(1), 115–125.

[URL] - <http://tierradecerveza.com/blog/el-misterioso-lupulo/>, *website* consultado a 17 de Fevereiro de 2015



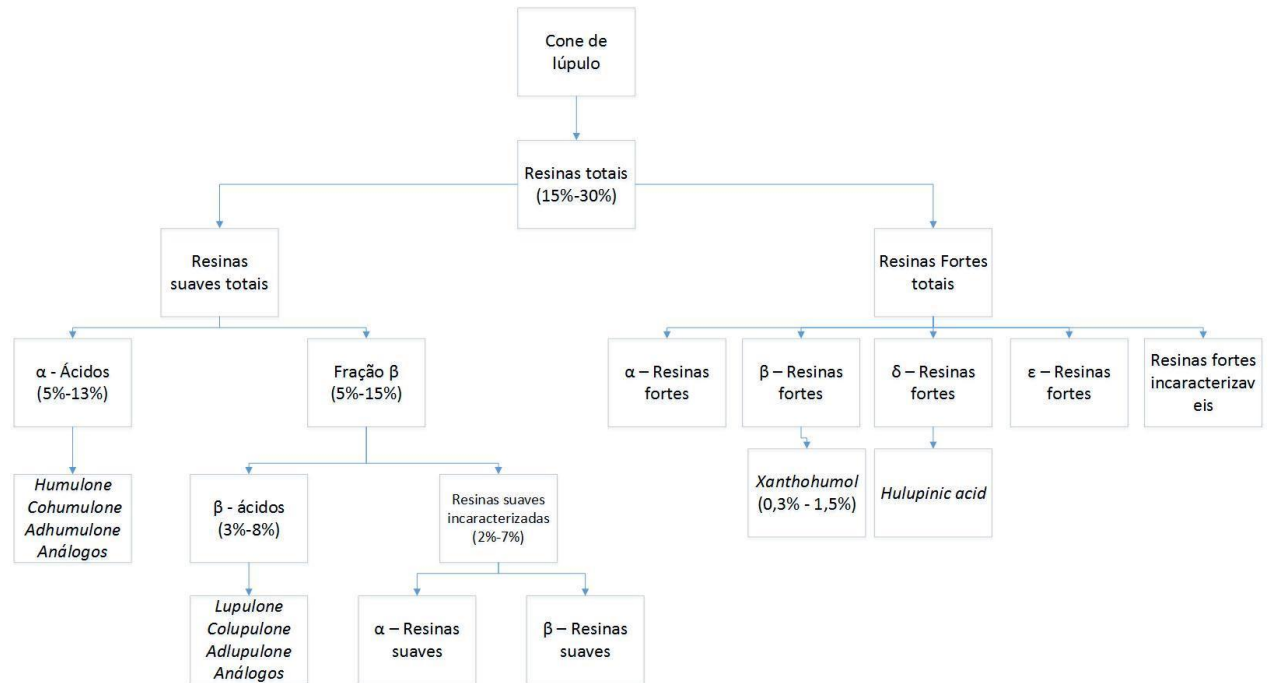
## ANEXOS

### Estrutura dos Anexos:

- Anexo I - Composição do Lúpulo
- Anexo II – Extrações Aquosas
  - Dados relativos aos métodos FRAP, IBU e GC-MS
- Anexo III – Cervejas
  - Dados relativos à monitorização das cervejas durante o tempo de prateleira

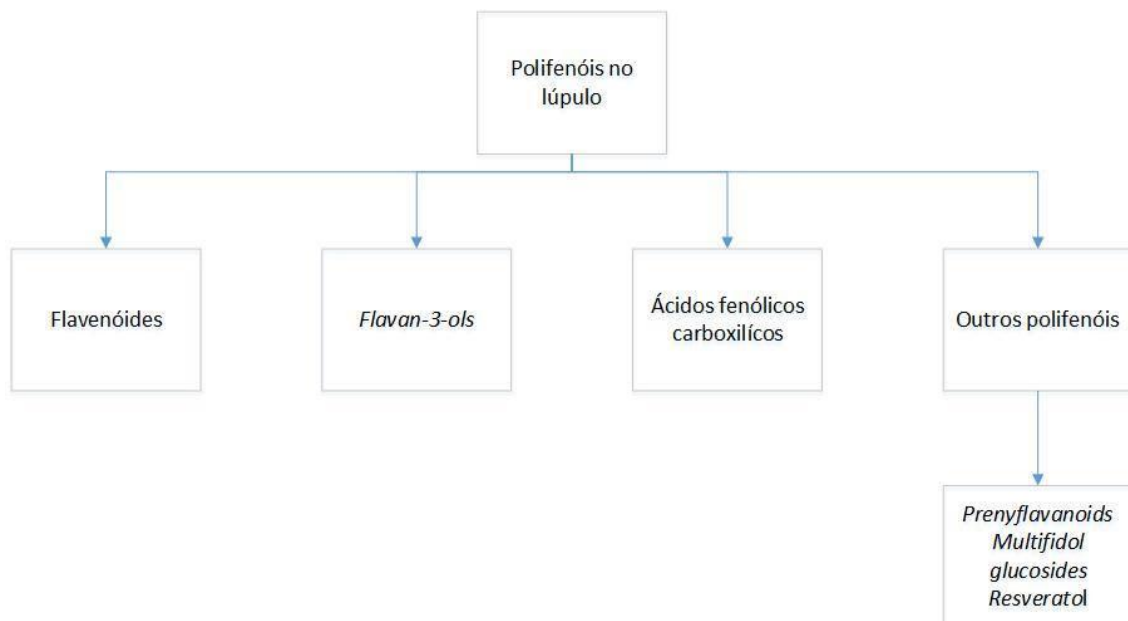
## ANEXO I – COMPOSIÇÃO DO LÚPULO

Na Figura A 1 está representada a constituição das resinas totais presentes na generalidade dos cones de lúpulo.



**Figura A 1** Esquema com os diferentes compostos presentes nas resinas do lúpulo. Adaptado de (Almaguer *et al.*, 2014).

Na Figura A 2 está apresentada os diferentes polifenóis presentes no lúpulo.



**Figura A 2** Esquema dos diferentes polifenóis presentes no lúpulo. Adaptado de (Almaguer *et al.*, 2014).

## ANEXO II - EXTRAÇÕES AQUOSAS

## FRAP

A curva de calibração que relaciona os valores de absorvência e as concentrações das soluções padrão é dada pelo gráfico da Figura A 3.

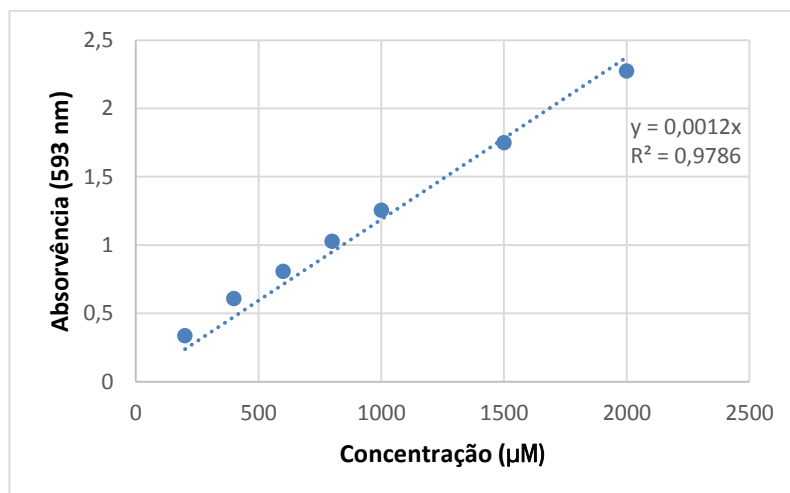


Figura A 3 Curva de calibração das soluções padrão.

As Concentrações de Fe (II) foram calculadas a partir da equação da recta das soluções padrões em que: x=concentração de Fe (II); y=Absorvência. Como as absorvências das amostras foram medidas em duplicado, obteve-se concentrações também em duplicado. De seguida calculou-se a média e os desvios padrões (erros) referentes a cada extração.

Tabela A 1 Dados do FRAP das extrações aquosas

Extrações Aquosas	Absorvência 1	Absorvência 2	Concentração (µM Fe (II)) 1	Concentração (µM Fe (II)) 2	Média
<i>Mash</i>	0,70	0,93	585,83	775,00	680,42 ± 133,76
<i>Pré-Boil</i>	1,02	1,05	850,83	875,83	863,33 ± 17,68
<i>Boil I</i>	1,07	1,20	894,17	998,33	946,25 ± 73,66
<i>Boil M</i>	1,09	1,07	910,00	894,17	902,08 ± 11,20
<i>Boil F</i>	1,05	1,03	871,67	860,83	866,25 ± 7,66
<i>Whirlpool</i>	0,94	1,04	783,33	865,83	824,58 ± 58,34

## IBU

Para o cálculo dos IBUs mediu-se as absorvências para cada extração aquosa em duplicado. Como po exemplo para a extração aquosa *Mash*:

$$\text{Diferença 1} = 3,19 - 3,11 = 0,07;$$

$$\text{IBU 1} = 0,07 \times 50 = 3,50.$$

Efetou-se os mesmos cálculos acima referidos para o IBU 2, e depois calculou-se a média e respetivos desvios padrão (erros), como se pode analisar na Tabela A 2.

**Tabela A 2** Dados da análise de IBUs relativa às extrações aquosas

Extrações Aquosas	Absorvência 1	Absorvência 2	Diferença 1	Diferença 2	IBU 1	IBU 2	Média
<i>Mash</i>	3,19	3,20	0,07	0,08	3,50	4,10	3,80 ± 0,42
<i>Pré-Boil</i>	3,34	3,35	0,22	0,23	11,20	11,60	11,40 ± 0,28
<i>Boil I</i>	3,34	3,33	0,22	0,21	10,95	10,40	10,68 ± 0,39
<i>Boil M</i>	3,30	3,32	0,18	0,20	9,20	10,05	9,63 ± 0,60
<i>Boil F</i>	3,33	3,33	0,22	0,22	10,80	10,85	10,83 ± 0,04
<i>Whirlpool</i>	3,27	3,32	0,16	0,21	7,80	10,25	9,03 ± 1,73

## Análise de compostos voláteis

A partir da cromatografia gasosas por espectrometria de massa foi possível identificar e quantificar alguns compostos voláteis. Na Tabela A 3 estão apresentados dados de área e concentração referentes a esses compostos. Para calcular a concentração foi necessário recorrer a alguns cálculos, como por exemplo na extração aquosa *Mash*:

$$\text{Concentração (4-nonanol)} = \frac{(2205000 \times 308)}{2205000} = 308 \mu\text{g/L}$$

$$\text{Concentração (linalol)} = \frac{104752 \times 308}{2205000} = 14,63 \mu\text{g/L}$$

$$\text{Concentração } (\alpha\text{-terpineol}) = \frac{23775 \times 308}{2205000} = 3,32 \mu\text{g/L}$$



**Tabela A 3** Dados analisados por GC-MS do linalol, 4-nonanol e  $\alpha$ -terpineol, relativos às extrações aquosas

Extrações Aquosas	Área			Concentração ( $\mu\text{g/L}$ )		
	linalol	4-nonanol	$\alpha$ -terpineol	linalol	4-nonanol	$\alpha$ -terpineol
<i>Mash</i>	104752	2205000	23775	14,63	308	3,32
<i>Pré-Boil</i>	78882	1259000	10036	19,30	308	2,46
<i>Boil I</i>	95385	1816000	17276	16,18	308	2,93
<i>Boil M</i>	80265	1249000	1211	19,79	308	0,30
<i>Boil F</i>	79689	1189000	9010	20,64	308	2,33
<i>Whirlpool</i>	4435	655679	4263	2,08	308	2,00

### ANEXO III - CERVEJAS

As análises dos parâmetros Brix, pH, velocidade de degradação da espuma e condutividade elétrica foram realizadas ao longo do tempo de prateleira (0; 15; 30; 45; 90 dias). Nas 4 tabelas seguintes estão apresentados as médias e os desvios padrão (erros) de cada variável para todas as cervejas ao longo do tempo de prateleira.

**Tabela A 4** Valores do Brix nas cervejas ao longo do tempo de prateleira

Brix <sup>o</sup>				
tempo (d)	<i>Whirlpool</i>	Controlo	Recirculação Quente	<i>Boil</i>
0	7,35 ± 0,07	6,25 ± 0,07	7,75 ± 0,07	5,55 ± 0,07
15	7,05 ± 0,07	5,65 ± 0,07	5,95 ± 0,07	5,45 ± 0,07
30	6,85 ± 0,07	5,35 ± 0,07	5,85 ± 0,07	5,05 ± 0,07
45	6,85 ± 0,07	5,35 ± 0,07	5,85 ± 0,07	5,45 ± 0,07
90	6,75 ± 0,07	5,35 ± 0,07	5,75 ± 0,07	5,05 ± 0,07

**Tabela A 5** Dados do pH nas cervejas ao longo do tempo de armazenamento

pH				
tempo (d)	<i>Whirlpool</i>	Controlo	Recirculação Quente	<i>Boil</i>
0	4,54 ± 0,03	4,42 ± 0,01	4,49 ± 0,03	4,40 ± 0,01
15	4,55 ± 0,01	4,49 ± 0,01	4,45 ± 0,01	4,39 ± 0,01
30	4,61 ± 0,01	4,47 ± 0,01	4,46 ± 0,01	4,45 ± 0,02
45	4,53 ± 0,01	4,43 ± 0,01	4,26 ± 0,01	4,29 ± 0,01
90	4,55 ± 0,01	4,45 ± 0,01	4,37 ± 0,01	4,31 ± 0,01

**Tabela A 6** Dados da velocidade de degradação da espuma nas cervejas ao longo do tempo de prateleira

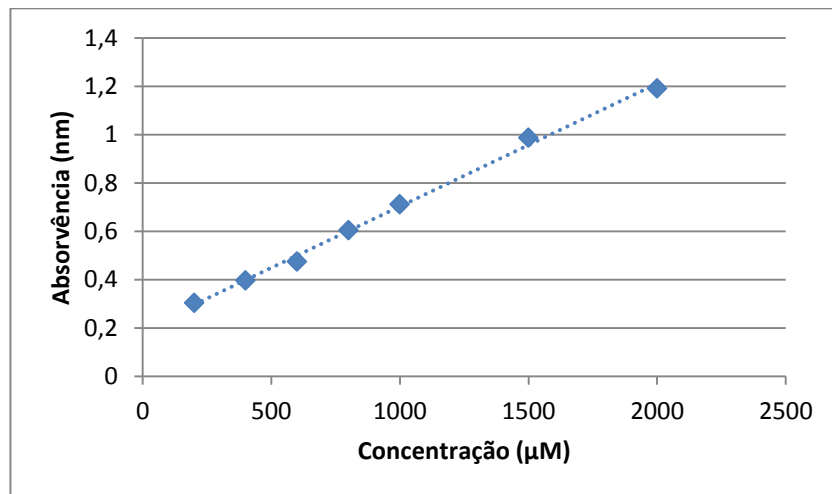
Velocidade de Degradação da Espuma (mm/s)				
tempo (d)	<i>Whirlpool</i>	Controlo	Recirculação Quente	<i>Boil</i>
0	116	602	119	289
15	102	547	246	260
30	102	547	246	260
45	80	414	130	243
90	135	620	207	229

**Tabela A 7** Valores da condutividade elétrica das cervejas ao longo do tempo de prateleira

tempo (d)	Condutividade Eléctrica (ms/cm)			
	<i>Whirlpool</i>	Controlo	Recirculação Quente	<i>Boil</i>
0	1,64 ± 0,12	1,48 ± 0,01	1,54 ± 0,05	1,57 ± 0,04
15	1,74 ± 0,01	1,91 ± 0,01	1,72 ± 0,01	1,72 ± 0,01
30	1,84 ± 0,01	1,82 ± 0,01	1,89 ± 0,01	1,80 ± 0,01
45	1,83 ± 0,01	1,81 ± 0,01	1,81 ± 0,01	1,77 ± 0,01
90	1,86 ± 0,01	1,80 ± 0,01	1,87 ± 0,01	1,80 ± 0,01

## FRAP

O cálculo da atividade antioxidante para as cervejas em  $t_i$  e  $t_f$ , foi efetuado do mesmo modo das extrações aquosas acima referido. Assim sendo na Figura A 4 está representada a curva de calibração realizada a partir das soluções padrão.



**Figura A 4** Curva de calibração das soluções padrão do relativas ao FRAP em  $t_f$ .

Na Tabela A 8 pode-se visualizar as médias e os desvios-padrão referentes às cervejas analisadas pelo método FRAP.

**Tabela A 8** Dados do método FRAP relativos às cervejas em ti e tf

tempo	Cervejas	Absorvência 1	Absorvência 2	Concentração ( $\mu\text{M Fe(II)}$ ) 1	Concentração ( $\mu\text{M Fe(II)}$ ) 2	Média
ti	<i>Boil</i>	0,68	0,69	2812,50	2862,50	2837,50 $\pm$ 35,36
	<i>Whirlpool</i>	0,67	0,69	2800,00	2862,50	2831,25 $\pm$ 44,19
	Recirculação Quente	0,63	0,66	2616,67	2741,67	2679,17 $\pm$ 88,39
	Controlo	0,74	0,77	3100,00	3225,00	3162,50 $\pm$ 88,39
tf	<i>Boil</i>	0,62	0,64	4457,14	4585,71	4521,43 $\pm$ 90,91
	<i>Whirlpool</i>	0,67	0,70	4750,00	5021,43	4885,71 $\pm$ 191,93
	Recirculação Quente	0,61	0,64	4350,00	4600,00	4475,00 $\pm$ 176,78
	Controlo	0,61	0,65	4364,29	4628,57	4496,43 $\pm$ 186,88

**IBU**

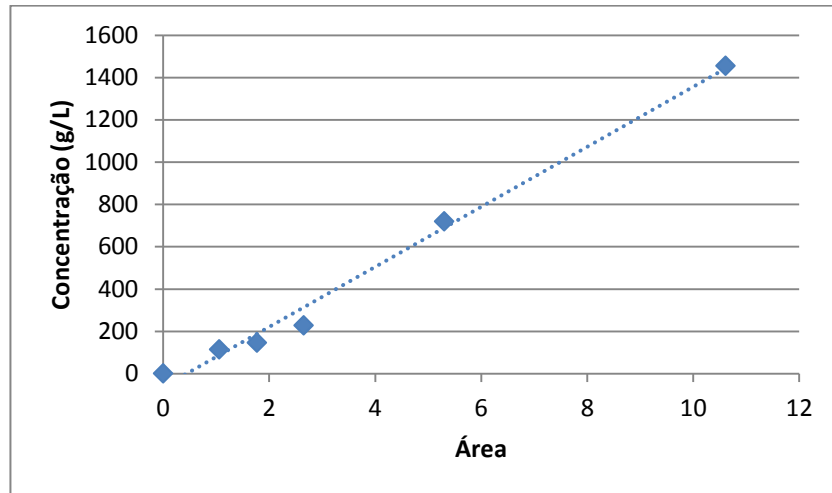
O cálculo dos IBUs para as cervejas em ti e tf, foi efetuado do mesmo modo das extrações aquosas referidas no Anexo II. Na Tabela A 9 estão representados dados referentes à análise de IBUs.

**Tabela A 9** Dados da avaliação de IBUs de todas as cervejas em ti e tf

Tempo	Cervejas	Absorvência 1	Absorvência 2	Diferença 1	Diferença 2	IBU 1	IBU 2	Média
ti	<i>Boil</i>	3,18	3,19	0,06	0,07	3,10	3,40	3,25 $\pm$ 0,21
	<i>Whirlpool</i>	3,24	3,24	0,12	0,12	6,05	6,05	6,05 $\pm$ 0,00
	Recirculação Quente	3,21	3,20	0,09	0,08	4,50	4,10	4,30 $\pm$ 0,28
	Controlo	3,29	3,28	0,17	0,17	8,65	8,25	8,45 $\pm$ 0,28
tf	<i>Boil</i>	3,27	3,26	0,15	0,14	7,50	6,90	7,20 $\pm$ 0,42
	<i>Whirlpool</i>	3,28	3,24	0,16	0,12	8,15	6,05	7,10 $\pm$ 1,48
	Recirculação Quente	3,29	3,24	0,17	0,12	8,70	5,90	7,30 $\pm$ 1,98
	Controlo	3,25	3,22	0,14	0,10	6,85	5,05	5,95 $\pm$ 1,27

## Etanol

Para ser possível calcular a concentração de etanol presente nas cervejas, primeiro foi realizada uma curva de calibração (Figura A 5) a partir de soluções padrão com diferentes concentrações de etanol.



**Figura A 5** Curva de calibração do etanol em Ti.

Dados referentes à curva de calibração em Tf:  $y=1372,2x$ ;  $R^2=0,9902$ , em que  $y$ =área e  $x$ =concentração etanol. A partir das áreas retiradas dos cromatogramas do HPLC relativas a cada cerveja, foram calculadas as concentrações consoante as equações das curvas de calibração. Depois de calculadas as concentrações relativas a cada cerveja, foram calculadas as % de etanol (v/v) e respectivos erros, como por exemplo para a cerveja *Boit*.

$$\% \left( \frac{v}{v} \right) = \frac{61,67}{0,789} = 7,82$$

Desvio-padrão (erro) a partir do  $R^2$  da curva de calibração em ti:

$$1 - 0,9796 = 0,0204 \rightarrow \frac{0,0204}{0,789} = 0,0025$$

$$SD \text{ (erro)} = 7,82 \times 0,0025 = 0,02$$

Consoante os cálculos acima efetuados para todas as cervejas em ti e tf, preencheu-se a Tabela A 10.

**Tabela A 10** Dados referentes ao etanol nas cervejas em ti e tf

tempo	Cervejas	Área	Concentração (g/L)	%(v/v)
ti	<i>Boil</i>	8207	61,67	7,82 ± 0,02
	<i>Whirlpool</i>	7021	52,76	6,69 ± 0,02
	Recirculação Quente	7332	55,10	6,98 ± 0,02
	Controlo	6118	45,98	5,83 ± 0,02
tf	<i>Boil</i>	80226,05	60,06	7,61 ± 0,02
	<i>Whirlpool</i>	59883,46	43,64	5,53 ± 0,02
	Recirculação Quente	80737,62	58,47	7,41 ± 0,02
	Controlo	82419,6	58,84	7,46 ± 0,02

### Análise de compostos voláteis

Na Tabela A 11 estão as áreas de cada composto que foram retiradas da cromatografia gasosa por espectrometria de massa, e também as concentrações calculadas a partir dessas áreas. Esses cálculos efectuaram-se da mesma forma do que para as extracções aquosas, como se pode verificar no Anexo II.

**Tabela A 11** Dados do linalol, 4-nonanol e  $\alpha$ -terpineol nas cervejas em ti e tf

tempo	Cervejas	Área			Concentrações ( $\mu$ g/L)		
		4-nonanol	linalol	$\alpha$ -terpineol	4-nonanol	linalol	$\alpha$ -terpineol
ti	<i>Boil</i>	1605000	106338	27006	308	20,41	5,18
	<i>Whirlpool</i>	764897	46592	20057	308	18,76	8,08
	Recirculação Quente	1238000	69936	28787	308	17,40	7,16
	Controlo	634696	68801	24330	308	33,39	11,81
tf	<i>Boil</i>	9914000	822151	0	308	25,54	0
	<i>Whirlpool</i>	6440000	576300	0	308	27,56	0
	Recirculação Quente	3486000	292884	0	308	25,88	0
	Controlo	6912000	544061	0	308	24,24	0