



Avaliação do poder antioxidante em cerveja artesanal com mirtilo

José Gomes da Silva

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Engenharia Biológica

Orientadores: Prof. Dr. Márcio José Rossi

Prof. Dr. Marília Clemente Velez Mateus

Júri

Presidente: Prof. Dr. Maria Ângela Cabral Garcia Taipa Meneses de Oliveira

Orientador: Marília Clemente Velez Mateus

Vogal: Dr. Fernando Manuel da Silva Gonçalves

Outubro 2019

Prefácio

O trabalho apresentado nesta tese foi realizado no departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil), durante o período mês de Março-Agosto 2019, sob a supervisão do Prof. Dr. Márcio Rossi. A tese foi co-orientada no Instituto Superior Técnico pela Prof. Dr. Marília Mateus.

Declaração

Declaro que o presente documento é um trabalho original da minha autoria e que cumpre todos os requisitos do Código de Conduta e Boas Práticas da Universidade de Lisboa

AGRADECIMENTOS

Este trabalho apenas foi possível ser concretizado graças ao apoio de diversas pessoas.

À minha mãe Elsa, ao meu irmão Miguel pelo apoio e incentivo que sempre me deram. Ao meu pai João por estar sempre presente. À Beatriz Rocha, pela motivação constante.

À República do Santo Condestável e aos residentes, por me ter acolhido na minha chegada a Lisboa e espero que consigam continuar com essa missão por longos anos. *P'la República!*

Ao meu orientador, o Professor Márcio Rossi pela oportunidade que me proporcionou em fazer esta dissertação na Universidade Federal de Santa Catarina e pela orientação.

Ao meu supervisor, o Professor José Miguel Müller pela disponibilidade e preciosa ajuda na produção da cerveja e à Professora Carmen Maria Oliveira Müller pela ajuda nos métodos analíticos.

Aos laboratórios MultiAli e LAMPB, por me ter proporcionado espaço e equipamentos para a realização do trabalho.

À Cervejeira Kairós por ter cedido o espaço para a análise sensorial, continuem com o excelente trabalho de promover a cerveja artesanal.

À Professora Marília Mateus pela orientação e ajuda na revisão.

Aos brasileiros com quem partilhei o meu semestre de Erasmus em Compiègne que me suscitaram a curiosidade de conhecer o Brasil.

Aos intercambistas em Florianópolis por todas as aventuras, trilhas e amizade.

Aos restantes amigos e familiares que me acompanham desde sempre, sem vocês não seira igual.

Resumo

O principal objetivo deste trabalho é avaliar fatores que influenciem o poder antioxidante de cervejas artesanais produzidas com a adição de mirtilo. O trabalho foi organizado em 4 *batch*, em que cada um deles foi realizado um experimento fatorial 2^2 na maturação, sendo os fatores estudados: quantidade de sumo, pH, temperatura, uso do mirtilo inteiro, teor de álcool e adição de gelatina. O poder antioxidante foi analisado pelos métodos de DPPH e FRAP e o teor de compostos fenólicos pelo método de Folin-Ciocalteu. As cervejas foram caracterizadas segundo: cor, amargor, quantidade de fruta adicionada, antocianinas, proteínas, pH, acidez titulável, açúcares redutores e sólidos totais. A diversidade dos mecanismos associados ao poder antioxidante e sua dependência com o método de análise não permitiu concluir qual tratamento promoveu maior poder antioxidante. Os fatores que potenciaram o poder antioxidante pelos dois métodos analisados e a concentração dos compostos fenólicos foram: 10% (m/v) de sumo, aumento de 2,2% (v/v) do teor alcoólico, tratamento térmico do mirtilo (10 min a 70°C) e a combinação dos últimos dois fatores. Após 2 meses de armazenamento, a concentração de compostos fenólicos teve um decaimento, sendo maior nas cervejas mantidas a 5°C comparando com as mantidas a temperatura ambiente (18-25°C). Sob envelhecimento forçado, observou-se que a cerveja sem adição de mirtilo e com um teor alcoólico de 7,7% (v/v), permitiu um maior decaimento, detetado pelos três métodos. Da análise sensorial, a cerveja com pH 3,9 obteve maior preferência, não tendo sido percebida diferença entre as amostras com a adição ou não das cascas.

PALAVRAS CHAVE: Cerveja artesanal, Poder Antioxidante, Mirtilo, Envelhecimento, Análise Sensorial

ABSTACT

The main objective of this work is to evaluate the factors that influence antioxidant power of blueberry beer.

This work is organized in 4 steps. A factorial experiment 2^2 is performed in each step during the maturation stage, studying different factors: amount of juice, pH, temperature, use of whole blueberry, alcohol and gelatin addition. The antioxidant power is analyzed by the DPPH and FRAP methods and the level of phenolic compounds by the Folin-Ciocalteu method. Beers are characterized according to: color, bitterness, amount of added fruit, anthocyanins, proteins, pH, titratable acidity, reducing sugars and total solid.

Different mechanisms are associated to antioxidant power which limits the conclusion of which sample has the highest antioxidant power – it depends on the analysis method. The factors that potentiate antioxidant power in the two analyzed methods and the concentration of the phenolic compounds are: 10% (w/v) of juice, the 2.2% (v/v) alcohol content increase, the blueberry heat treatment (10 min at 70°C) and the combination of the latter two factors.

After 2 months of aging, the concentration of phenolic compounds had a higher decay in samples kept at 5°C compared to those at room temperature (18-25 °C). Under forced aging, the beer sample without the addition of blueberry and with an alcohol content of 7.7% (v/v), showed a higher decay, according to the three methods.

In the sensorial analysis, the beer with pH 3.9 was preferred and no difference was perceived between the samples with or without the addition of peels.

Keywords: Craft beer, Antioxidant power, Blueberry, Aging, Sensorial Analysis

Índice

1	Introdução.....	1
2	Objetivo.....	3
2.1	Objetivo geral.....	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
3	Revisão da literatura.....	4
3.1	Oxidação lipídica e antioxidantes.....	4
3.2	Compostos fenólicos.....	5
3.3	Antocianinas.....	7
3.4	Mirtilo.....	7
3.5	Métodos de determinação de antioxidantes.....	8
3.6	Matérias-primas.....	8
3.6.1	Malte.....	8
3.6.2	Lúpulo.....	9
3.6.3	Levedura.....	9
3.6.4	Adjuntos.....	9
3.7	Processo de produção de cerveja.....	10
3.7.1	Moagem.....	10
3.7.2	Brassagem.....	10
3.7.3	Filtração.....	10
3.7.4	Fervura.....	10
3.7.5	Fermentação.....	10
3.7.6	Maturação.....	11
3.8	Cálculos cervejeiros.....	11
3.9	Estilos de cerveja segundo o <i>Beer Judge Certification Program</i>	12
3.10	Colorimetria.....	14
3.11	Envelhecimento.....	14
4	Material e métodos.....	15
4.1	Insumos.....	15
4.2	Químicos.....	15
4.3	Experimentos.....	15
4.4	Produção da cerveja.....	17
4.5	Processamento do mirtilo.....	19
4.6	Engarrafamento.....	19
4.7	Ensaio DPPH.....	19
4.8	Ensaio FRAP (<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>).....	20
4.9	Compostos fenólicos.....	20
4.10	Determinação de cor.....	20
4.11	Amargor.....	21

4.12	Densidade.....	21
4.13	Álcool.....	21
4.14	Proteínas.....	21
4.15	Açúcares redutores.....	22
4.16	Concentração de sólidos totais.....	22
4.17	Acidez total titulável.....	22
4.18	Quantificação de antocianinas.....	23
4.19	Envelhecimento.....	23
4.20	Análise microbiológica.....	24
4.21	Análise sensorial.....	24
4.22	Análise estatística.....	25
5	Resultados e discussão.....	26
5.1	Experimento 1.....	27
5.2	Experimento 2.....	30
5.3	Experimento 3.....	33
5.4	Experimento 4.....	36
5.5	Colorimetria.....	38
5.6	Envelhecimento natural.....	39
5.7	Envelhecimento forçado.....	40
5.8	Análise das componentes principais.....	41
5.9	Análise sensorial.....	43
6	Conclusões.....	44
7	Perspetivas futuras.....	45
8	Referências.....	47
9	Anexos.....	49
9.1	A1: Qualidade da água (Março/2019)-Florianópolis (BR).....	49
9.2	A2: Ficha técnica de produção.....	50
9.3	A3: Curvas de calibração.....	54
9.4	A4: Leveduras (<i>Saccharomyces</i>) e bactéria (<i>Lactobacillus brevis</i>)-Dados do fornecedor. ..	55
9.5	A5 Correlação das variáveis e o seu respetivo peso nas quatro componentes principais (PC1, PC2, PC3 e PC4). ..	57
9.6	A6: Questionário da análise sensorial.....	58
9.7	A7: Propagação de desvios.....	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-Sistema de três painéis para a produção do mosto. Legenda: 1-Painel de fervura; 2-Painel de brassagem; 3-Painel de água 70 °C; 4-Fonte de calor (fogão a gás); 5-Botija de gás propano. 18
- Figura 2-Fermentador de inox 50 L com controlo de temperatura (Novus N480D) (temperatura de operação 0 a 25 °C) utilizado para a fermentação primária. 19
- Figura 3-Cabines para a análise sensorial (espaço cedido pela cervejeira Kairós, Florianópolis, Brasil). 25
- Figura 4-Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das cervejas do Experimento 1 em função do fator X_2 (quantidade de mirtilo adicionado no início da maturação) e do fator X_1 , {temperatura dos três primeiros dias de maturação (5 °C (■) e 18 °C (■))}. O controlo refere-se a cerveja sem adição de mirtilo. 29
- Figura 5-Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste t do Experimento 1, sendo X_1 a temperatura de maturação dos três primeiros dias (nível -1: 5 °C e nível +1: 18 °C), X_2 quantidade de mirtilo adicionado (nível -1: 5 % (m/v) e nível +1: 10 % (m/v)) no início da maturação e X_1 vs. X_2 , a combinação dos dois fatores da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C). 29
- Figura 6- Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das cervejas do Experimento 2 em função do fator X_2 {inteiro= 70% sumo+30% casca (nível -1) ou sumo=100% sumo (nível +1)} e do fator X_1 {pH no início da maturação (pH 3,9 (■) e pH 3,4 (■))}. 31
- Figura 7-Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste t do Experimento 2, sendo X_1 pH no início da maturação (nível -1: 3,9 e nível +1: 3,4), X_2 a adição de 70% sumo+30% casca (inteiro) (nível -1) ou 100 % sumo (sumo) (nível +1) e X_1 vs. X_2 , a combinação dos dois fatores da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C). 31
- Figura 8- Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das cervejas do Experimento 3 em função do fator X_2 (controlo e utilização do mirtilo congelado (nível -1) ou com tratamento térmico (nível +1)) e do fator X_1 , álcool (nível -1: 5,5 (% v/v) (■) e nível +1: 7,7 (% v/v) (■)). 34
- Figura 9- Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste t do Experimento 3, sendo X_1 o teor alcoólico em % v/v (nível -1: 5,5 e nível +1: 7,7), X_2 utilização do mirtilo congelado (nível

-1) ou com tratamento térmico (nível +1) e X1 vs. X2, a combinação dos dois fatores, da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C).	34
Figura 10- Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das amostras do Experimento 4 em função do fator X ₂ (adição do mirtilo no dia 0 (nível -1) no dia 14 (nível +1) da maturação) e do fator X ₁ , a utilização de gelatina (nível -1: com adição de 0,3 g/L (■) e nível +1: sem adição (■)).	37
Figura 11-Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste t do Experimento 4, sendo X ₁ a utilização de gelatina (nível -1: com adição de 0,3 g/L e nível +1: sem adição), X ₂ a adição do mirtilo no dia 0 (nível -1) no dia 14 (nível +1) da maturação e X1 vs. X2, a combinação dos dois fatores, da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C).....	37
Figura 12- Decaimento (%) da atividade antioxidante (analisado pelo método DPPH e FRAP) e da concentração de compostos fenólicos (analisada pelo método Folin-Ciocalteu) após 60 dias de envelhecimento natural a temperatura ambiente (18-25 °C) (A) e a temperatura de 5 °C (B) das cervejas do Experimento 2. Legenda: ■-5C; ■-5:200; ■-5:400; ■-18C; ■-18:200; ■-18:400.	40
Figura 13-Decaimento (%) da atividade antioxidante pelo método DPPH e FRAP e da concentração de compostos fenólicos obtidos pelo método Folin-Ciocalteu do envelhecimento forçado durante 7 dias a 50 °C (equivalente a 7 meses de envelhecimento natural a 25 °C) das amostras do Experimento 3. Legenda: ■-5,5C; ■-5,5C; ■-5,5:T; ■-7,7C; ■-7,7:F; ■-7,7:T.	40
Figura 14- Análise das componentes principais PC1 vs. PC2.	42
Figura 15-Hábito do consumo do estilo Catharina Sour dos 34 provadores da análise sensorial (n=34). ■-Primeira vez; ■-Até 5 tipos diferentes; ■-Mais do que 5 tipos diferentes.....	43
Figura 16-Resposta ao interesse de compra de uma cerveja com a informação: "Cerveja com antioxidantes naturais". ■-Sim; ■-Não ■-Indiferente.....	43
Figura 17- Resposta ao interesse de compra de uma cerveja com a informação: "Cerveja elaborada com produtos regionais". ■-Sim; ■-Não ■-Indiferente.	43
Figura 18- Curva de calibração do método DPPH: Concentração de Trolox (µM) em função da percentagem de inibição ($y=0,089x+2,25924$ e $R^2=0,995$).....	54
Figura 19-Curva de calibração do método FRAP: Absorvância a 620 nm em função da concentração de Trolox (µM) ($y=0,0013x-0,00614$ e $R^2=0,987$).....	54
Figura 20-Curva de calibração do método Folin-Ciocalteu: Absorvância a 760 nm em função da concentração (mg GAE/L) ($y=0,0011x+0,0171$ e $R^2=0,998$).....	54
Figura 21-Curva de calibração para o método DNS: Absorvância a 575 nm em função da concentração de açúcares redutores (g/L) ($y=0,478x-0,091$ e $R^2=0,997$).....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Taxa de conversão em função do tempo de fervura e da densidade do mosto (Palmer, 2006).	12
Tabela 2- Características do estilo <i>Pilsen (German Pils)</i> (BJCP, 2015).....	13
Tabela 3- Características do estilo <i>Catharina Sour</i> (BJCP, 2015).	13
Tabela 4- Características do estilo <i>American Strong Ale</i> (BJCP, 2015).....	13
Tabela 5- Características do estilo <i>Oatmeal Stout</i> (BJCP, 2015).....	14
Tabela 6- Matriz do delineamento experimental com valores codificados (X_1 e X_2).....	15
Tabela 7- Resumo do planejamento fatorial 2 ² dos experimentos. Sendo X_1 o fator relacionado com a cerveja e X_2 , o fator relacionado com a adição do mirtilo, desdobrados em dois níveis: inferior (-1) e superior (+1). A-Experimento 1 (<i>Pilsen</i>); B-Experimento 2 (<i>Catherina Sour</i>); C- Experimento 3 (<i>American Strong Ale</i>); D-Experimento 4 (<i>Oatmeal Stout</i>).....	17
Tabela 8- Características das cervejas de cada grupo submetidas à análise sensorial e o respetivo valor código (entre parêntesis).	24
Tabela 9 - Resumo dos parâmetros das amostras de cervejas controlo dos Experimentos.....	26
Tabela 10- Valores médios e respetivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 1. Sendo o X_1 , a temperatura dos 3 primeiros dias de maturação, 5 °C (5) e 18 °C (18) e X_2 a massa adicionada de sumo mirtilo em gramas (200 e 400). As amostras 5C e 18C correspondem às amostras controlo do fator X_1 , sem a adição de mirtilo.	30
Tabela 11- Valores médios e respetivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 2. Sendo o X_1 , o valor de pH (3,9 e 3,4) no início da fase de maturação e X_2 , a utilização do mirtilo inteiro (I) ou do sumo (S). As amostras 3,9C e 3,4C correspondem às amostras controlo do fator X_1 , sem a adição de mirtilo.	33
Tabela 12- Valores médios e respetivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 3. Sendo o X_1 , o teor alcoólico (5,5 e 7,7 % v/v) no início da fase de maturação e X_2 , a utilização do mirtilo congelado (F) ou com tratamento térmico (T). As amostras 5,5C e 7,7C correspondem às amostras controlo do fator X_1 , sem a adição de mirtilo.	35
Tabela 13- Valores médios e respetivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 4. Sendo o X_1 , a utilização de gelatina (sem adição (S) e com adição de 0,3 g/L (G) e X_2 , o momento da adição do mirtilo (no início da maturação ou no momento do envase (E). As amostras SC e GC correspondem às amostras controlo do fator X_1 , sem a adição de mirtilo.	38
Tabela 14- Valores médios das coordenadas de cor das amostras (L^* -luminosidade; a^* -vermelho vs. verde; b^* -amarelo vs. azul), tonalidade (h^*), saturação (C^*) e a distância entre as amostras e o respetivo controlo (ΔE^*).	39
Tabela 15- Eigenvalue da matriz das correlações e estatísticas relacionadas.	41
Tabela 16- Avaliação sensorial segundo a escala hedónica de 9 classificações entre 1 (Desgostei muitíssimo) e 9 (Gostei muito) (n=34).	43
Tabela 17- Resultados da avaliação dos parâmetros Acidez e Percepção da fruta na escala JAR com 5 classificações (1-Pouco a 5-Muito).....	44

Lista de Abreviaturas

ABV	Teor de álcool
CIE	<i>Commission Internationale de l'Éclairage</i>
DPPH	1,1-Difenil-2-picrilhidrazil
EBC	<i>European Brewery Convention</i>
FG	Densidade final
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
IBU	<i>International Bitterness Units</i>
JAR	Escala <i>Just-About-Right</i>
OG	Densidade original
PC	Componente principal
PCA	Análise dos componentes principais
SRM	<i>Standard Reference Method</i>
TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina

1 Introdução

A cerveja é a provavelmente a bebida alcoólica mais consumida no mundo por ser uma bebida fresca, com baixas calorias e valor nutricional. A produção de cerveja envolve reações químicas e bioquímicas. O produto final possui vários compostos com atividade antioxidante provenientes das matérias-primas ou formadas durante o processo. As espécies e as concentrações desses antioxidantes estão em constante alteração no produto final devido à tecnologia cervejeira, às matérias-primas, sujeitas à variação entre lotes ou anos de colheita. Pequenas alterações na estrutura ou na conformação dos metabolitos com poder antioxidante podem causar alterações significativas na atividade antioxidante, o que pode alterar de modo geral a estabilidade do sabor da cerveja.

Atualmente a estabilidade do sabor tem vindo a ser o parâmetro selecionado para estudar o tempo de meia vida da cerveja engarrafada. Apesar da estabilidade do sabor depender essencialmente da quantidade de oxigênio presente na cerveja engarrafada, o processo de produção e as matérias-primas podem ser utilizadas para promover a estabilidade do sabor.

Os componentes utilizados, como a água, os cereais, a cevada e a levedura, são fontes de metais que vão posteriormente fazer parte da cerveja. A quantidade de metais numa cerveja é variável e depende da qualidade dos substratos utilizados e o tipo de cerveja. Além das fontes diretas de metais, existe a contaminação dos solos, que pode ter origem nos fertilizantes, pesticidas e processos industriais e que entram depois como fontes de metais na cerveja que podem dar início ao processo de oxidação da cerveja (Pohl, 2008).

Segundo os dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), até setembro de 2018 registrava-se um crescimento de 23% no número de cervejeiras artesanais. Das 800 cervejeiras brasileiras, 102 encontram-se no Estado de Santa Catarina. Em cinco anos a cota de mercado das cervejas artesanais no Brasil passou de 1% aos 3% atuais com previsão de chegar aos 6% nos próximos cinco anos. Embora a cota de mercado seja pequena, de acordo com o Ministério do Trabalho e Emprego foram criados 1757 novos postos de trabalho entre janeiro e outubro de 2018, sendo que 800 postos de trabalhos foram criados por microcervejeiras que empregam até 4 funcionários (mais de 45% do total).

Atualmente, a preocupação das pessoas com a saúde e a busca por alimentos considerados mais saudáveis têm resultado em aumento no consumo de bebidas à base de frutas e/ou extratos vegetais. Alguns países já produzem cervejas de frutas ou "*fruit beers*", com diversos sabores, o que indica o grande potencial e diversidade desses adjuntos na elaboração de cervejas. Observando esta tendência de mercado, as microcervejeiras vêm desenvolvendo novos tipos de cerveja, com aromas e sabores diferenciados, a fim de atender às novas necessidades e preferências dos consumidores de cerveja.

No final de 2014, as cervejeiras do Estado de Santa Catarina (Brasil) lançaram cervejas baseadas no estilo alemão *Berliner Weisse*, porém com adição de frutas, o estilo passou a ser

popularizado mais em 2016 quando o Associação das Microcervejarias Artesanais de Santa Catarina (ACASC) tomou a iniciativa em conjunto com os cervejeiros de propagar essa modalidade de cerveja que tem por base uma cerveja híbrida de trigo, o mosto acidificado com *Lactobacillus* e a fermentação realizada com leveduras neutras de alta fermentação. Em Junho de 2018, o *Beer Judge Certification Program* (BJCP), reconheceu o estilo *Catharina Sour* como um estilo de cerveja provisório que poderá ingressar nas diretrizes oficiais.

Os frutos contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes como minerais, fibras e vitaminas, outros compostos secundários de natureza fenólica e com poder antioxidante (Segtowitz *et al.*, 2013). Os compostos fenólicos presentes na cerveja, além de estarem diretamente relacionados com a qualidade físico-química e sensorial (sabor, aroma, cor), estabilidade coloidal e conservação da cerveja, contribuem de forma benéfica na saúde humana. A ingestão moderada de cerveja, está associada à prevenção de doenças, como inflamações e doenças cardiovasculares (Callemien e Collin, 2009). Além disso, os compostos fenólicos têm efeito direto no metabolismo HDL (colesterol bom), apresentando ainda atividades funcionais como ação anti-carcinogénicas e anti-trombóticas (Ghiselli *et al.*, 2000).

2 Objetivo

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo desenvolver uma cerveja artesanal com adição de mirtilo, visando aumentar o poder antioxidante e o teor de compostos fenólicos, avaliar a sua estabilidade durante o armazenamento e o interesse do consumidor.

2.2 Objetivos específicos

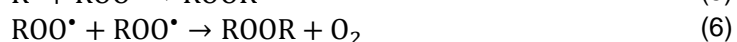
- Produzir 4 *batch* de cerveja artesanal com mirtilo (diferentes estilos: *Pilsen*, *Catherina Sour*, *American Strong Ale* e *Oatmeal Stout*);
- Avaliar o poder antioxidante e teor de compostos fenólicos em experiências fatoriais 2² variando a adição de mirtilo, pH, álcool, temperatura e proteínas;
- Avaliar o poder antioxidante e compostos fenólicos antes e após o engarrafamento assim como durante o armazenamento a temperatura ambiente e a baixa temperatura (5 °C) e comparar com a cerveja sem adição de mirtilo;
- Caracterizar o produto final: cor, amargor, quantidade de fruta, antocianinas densidade final, álcool, proteínas, acidez titulável, pH, antocianinas, açúcares redutores e sólidos totais;
- Realizar uma análise sensorial para verificar a preferência do consumidor pela cerveja com mirtilo.

3 Revisão da literatura

3.1 Oxidação lipídica e antioxidantes

A deterioração oxidativa dos alimentos é responsável para diminuição da qualidade organolética e nutricional dos alimentos, gerando odores e sabores rançosos (*off-flavors*), mudança na cor e textura.

A oxidação lipídica (equações 1 a 6) é uma das maiores causas dessa deterioração nos alimentos e ocorre geralmente em três etapas: iniciação, propagação e terminação. Em primeiro lugar, um átomo de hidrogênio é separado da molécula lipídica, formando um radical livre (R^\bullet), podendo ser causada por radiação ou por oxidação química. Essa molécula é altamente reativa reagindo com o oxigênio (O_2) formando um radical peróxido (ROO^\bullet) que por sua vez reage com o hidrogênio de uma nova molécula lipídica, formando um radical hidroperóxido ($ROOH$) e um radical lipídico (R^\bullet). Essa reação propaga-se até que a etapa da terminação ocorre quando dois radicais livres se combinam para formar um produto não radicalar, termodinamicamente estável (Decker *et al.*, 2010).

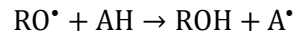


Para evitar essa reação em cadeia deve-se:

- Minimizar os ativadores de oxidação exógenos: guardar no frio, evitar exposição à luz especialmente a radiação UV;
- Eliminar ativadores de oxidação endógenos: evitar ou reduzir presença de metais (Cu, Fe) e peróxidos;
- Eliminar o oxigênio sempre que possível e manter níveis baixos de oxigênio durante o processamento e armazenamento.
- Ou utilizar compostos antioxidantes sintéticos e/ou naturais tais como sulfitos, formaldeído ou ascorbato, para melhorar a estabilidade do sabor.

Devido a regulações e pressão do consumidor, os aditivos, principalmente sintéticos têm sido menos usados. Dessa forma, é preferível evitar a oxidação com os antioxidantes endógenos da própria cerveja, provenientes das matérias-primas ou formados ao longo do processo de maltagem, fervura e fermentação (Preedy, 2014).

Os compostos antioxidantes possuem a capacidade de doar elétrons e/ou átomos de hidrogénio aos radicais livres formados nas etapas de iniciação e propagação da oxidação (R^\bullet , RO^\bullet e ROO^\bullet). O principal mecanismo de ação dos compostos antioxidantes (AH) pode ser descrito por:



O radical A^\bullet formado pela ação dos antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático que normalmente possuem.

Os antioxidantes possuem outros mecanismos para prevenir a oxidação, e segundo o qual são classificados. Podem ser primários, sinergistas, removedores de oxigénio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogénio a essas moléculas, interrompendo a reação radical em cadeia. Os sinergistas são substâncias com pouca ou nenhuma atividade antioxidante, que podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles. Agem como doadores de hidrogénio regenerando os antioxidantes primários ou inativando iões metálicos. São principalmente sequestradores de oxigénio ou quelantes de metais. Alguns antioxidantes primários quando usados em combinação podem atuar sinergisticamente. Os removedores de oxigénio são compostos que atuam capturando o oxigénio presente no meio, através de reações químicas estáveis, tornando-os, conseqüentemente, indisponíveis para atuarem como propagadores da autooxidação. Os antioxidantes biológicos incluem várias enzimas, como glucose oxidase, superóxido dismutase e catalases. Essas substâncias podem remover oxigénio ou compostos altamente reativos de um sistema alimentício. Os agentes quelantes/sequestrantes complexam iões metálicos, principalmente cobre e ferro, que catalisam a oxidação lipídica. Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (Pokorný, 2001).

Os antioxidantes podem inibir ou atrasar a oxidação, mas não melhoram a qualidade de um produto já oxidado. Especialmente em sistemas lipídicos, a reação de degradação é irreversível (Schuler, 1990).

3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são formados no mínimo por um anel aromático e com uma ou mais hidroxilas, formando cerca de 8000 compostos com estruturas diferentes. Essas moléculas podem ser encontradas em frutas e legumes, como mecanismo de defesa, e encontram-se diretamente relacionados com propriedades sensoriais, tais como a cor e a adstringência. Possuem a capacidade de atuar como doador de hidrogénio ou atuar como um agente quelante de iões metálicos como o ferro e o cobre, inibindo a oxidação de lipoproteínas.

Os compostos fenólicos (PhOH) reduzem ou inibem os radicais livres ao transferir um átomo de hidrogénio do grupo hidroxilo (OH). A reação de um composto fenólico com um radical peróxido (ROO•) envolve a transferência de um catião de hidrogénio do fenol para o radical, formando um estado de transição com uma ponte de hidrogénio. A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é fortemente reduzida quando o meio favorece a formação de ligações de hidrogénio com os compostos fenólicos. Por exemplo, o álcool possui em efeito duplo na reação entre o fenol e o radical peróxido. Por um lado, o álcool pode formar ligações de hidrogénio com os fenóis, não permitindo a reação do fenol com o radical. Por outro lado, favorece a ionização dos fenóis favorecendo a transferência do átomo hidrogénio para o radical. O efeito global do solvente sobre a atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende em grande parte do grau de ionização (Foti, 2007).

A cerveja é geralmente considerada uma das maiores fontes de compostos fenólicos. Esses compostos são maioritariamente ácidos fenólicos e flavonóides. Os principais ácidos fenólicos identificados são os ácidos gálico e férulico, e os flavonóides (+)-catequina e formononetina, respetivamente. Os ingredientes da cerveja, o malte e o lúpulo, possuem diversos ácidos fenólicos e flavonóides (uma classe de polifenóis), que são encontrados no produto final. Ácidos p-cumárico, cafeico, férulico, sinápico e clorogénico estão presentes no malte e no lúpulo. A maioria dos ácidos fenólicos no malte ou no lúpulo encontram-se esterificados com o amido ou com outros polissacarídeos por pontes ou *cross-links* através de pontes de hidrogénio, ligações covalentes ou quelação. Estas ligações são quebradas por hidrólise enzimática durante a brassagem (Preedy, 2014).

Os compostos fenólicos possuem pelo menos dois locais de ligação onde se podem ligar proteínas e a essas proteínas podem ligar-se outros polifenóis, resultando num complexo que pode crescer, tornando-se insolúvel na cerveja e precipitar. A interação proteína-polifenol é influenciado pela concentração de proteínas, polifenóis, polissacarídeos, teor de álcool, oxigénio, pH, temperatura, força iónica e iões metálicos. A temperatura tem uma influência significativa no aumento da turbidez por acelerar a reação de ligação entre proteínas e polifenóis. Assim, a pasteurização ou o armazenamento a temperaturas mais altas aceleram a formação da turbidez. A oxidação ou a presença de oxigénio promove a polimerização dos fenóis que por consequência se ligam com mais facilidade às proteínas (Zhao e Sun-Waterhouse, 2018).

A quantidade de proteínas é praticamente inalterada durante a fermentação, mas a exposição a baixa temperatura pode levar à precipitação do complexo proteína-polifenol. A autólise das leveduras liberta para a cerveja uma larga quantidade de proteínas, como proteases que podem degradar proteínas essenciais para a estabilidade da espuma em especial em mostos com elevada densidade. Quando a cerveja entra na etapa de maturação e clarificação, os complexos proteína-polifenóis precipitam ou podem ser filtrados. Gelatina pode ser usada para flocular a levedura em suspensão mas também pode ser usada para agregar e precipitar proteínas. As proteínas também podem ser removidas adicionando gel de sílica de forma contínua na tubulação até ao filtro final. Esse método apenas remove as proteínas causadoras de turbidez e não as proteínas responsáveis pela espuma. As proteínas que permanecem até ao produto final são responsáveis pela formação de turbidez e estabilidade da espuma, mas também contribuem para o corpo e sensação em boca. Para além disso,

os aminoácidos e péptidos são nutrientes para microrganismos contaminantes pois além de aumentar o pH da cerveja dificulta a sua estabilização em termos de turbidez e microbiologia (Lewis e Bamforth, 2006).

Segundo Gerhauser (2005), 20-30% dos constituintes fenólicos presentes na cerveja provêm do lúpulo e 70-80% do malte, fazendo com que o conteúdo total de antioxidantes no produto dependa do tipo de cerveja, das matérias-primas e do tipo de fabricação utilizado. Como exemplo dessa complexidade, o uso de aveia na formulação pode aumentar o teor de polifenóis, ao passo que pode ter um efeito também contrário, pela complexação com suas proteínas. Assim, a quantidade de compostos fenólicos é dependente das matérias-primas usadas. Os trabalhos de Freitas *et al.*, (2006) e Tafulo *et al.*, (2010) mostraram que as cervejas claras de trigo apresentaram maiores valores de compostos fenólicos do que as cervejas claras de cevada. Vinson *et al.* (2003) reportaram que os polifenóis totais em cervejas mais escuras como *Porters* e *Stout* e em cervejas de alta fermentação (Ale) se encontram em maior quantidade comparado com as cervejas de baixa fermentação (Lager) e cervejas sem álcool. As cervejas escuras possuem geralmente mostos com maior extrato (maior densidade), enquanto que as cervejas sem álcool são produzidas com uma menor quantidade de malte. Aumentar a quantidade de malte na formulação, aumenta a densidade do mosto, sendo observadas maiores quantidades de compostos fenólicos.

3.3 Antocianinas

As antocianinas são pigmentos naturais hidrossolúveis de origem vegetal responsáveis pela diversidade de cores observada em frutos, legumes, folhas e flores, tendo como função a proteção contra os danos causados por raios UV ao absorverem a luz. São compostos fenólicos que pertencem ao grupo dos flavonóides. Contêm ligações duplas conjugadas, responsáveis pela absorção da luz em torno de 500 nm, e são deficientes em elétrons tornando esses compostos muito reativos.

3.4 Mirtilo

O mirtilo, embora seja uma espécie de introdução recente no Brasil, é amplamente cultivado em países do Hemisfério Norte, principalmente Europa e Estados Unidos. Nessas regiões, a espécie tem grande valor comercial, sendo amplamente explorados seus benefícios como alimento funcional, devido aos seus pigmentos naturais, principalmente as antocianinas (Da Rocha, 2009). Esse fruto vem despertando a atenção dos produtores e do mercado consumidor mundial, destacando-se devido ao grande interesse do mercado consumidor, tanto no interno quanto no externo, às propriedades funcionais, ao sabor e cor atraentes, ao seu elevado valor agregado e à ampla possibilidade de industrialização. É um fruto rico em antioxidantes, que possui elevado conteúdo de polifenóis tanto na casca quanto na polpa, nomeadamente uma elevada concentração de antocianinas (Antunes e Raseira, 2006).

Em relação às condições de extração dos compostos com poder antioxidante do mirtilo, Kalt *et al.* (2000) reportam que a extração de antocianinas a pH 1 resulta em extratos com mais poder antioxidante comparativamente a extratos obtidos a pH 4 e pH 7. Em relação à temperatura, os mesmos autores identificaram que a extração a 60 °C possui maior rendimento comparado com 25 °C, sendo

que o armazenamento à temperatura ambiente resulta em perdas de antocianinas e capacidade antioxidante apenas nos extratos obtidos a 60 °C.

3.5 Métodos de determinação de antioxidantes

Os antioxidantes endógenos presentes na cerveja são complexos, sendo os seus mecanismos antioxidantes dependentes da composição e das condições do meio. Os resultados podem ser diferentes mesmo usando a mesma amostra em diferentes métodos de determinação, uma vez que a atividade antioxidante está relacionada com diferentes mecanismos reacionais. Dessa forma, é necessário recorrer a mais de um método para quantificar a atividade antioxidante.

Diferentes técnicas têm sido desenvolvidas a fim de determinar a atividade antioxidante *in vitro*. No entanto, essa diversidade de metodologias gera resultados difíceis de serem comparados, uma vez que não há um método universal capaz de medir a capacidade antioxidante de todas as amostras com precisão, já que os mecanismos antioxidantes são diferentes.

A capacidade de sequestrar radicais pode ser medida segundo o método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995) e a atividade antioxidante pode ser avaliada quanto ao poder de redução do ião ferro baseado no método proposto por Benzie e Strain (1996). Em ambos os métodos, na presença de compostos antioxidantes há uma alteração da tonalidade da mistura de reação que pode ser medida por espectrofotometria nos comprimentos de onda 517 e 620 nm, respetivamente.

A reação de Folin-Ciocalteu é baseada na formação de cor que é formada devido à redução química do reagente de Folin. Essa reação pode quantificar os compostos fenólicos, mas também os produtos de reação de Maillard e outros interferentes com capacidade redutora (Cechovská *et al.*, 2012).

3.6 Matérias-primas

3.6.1 Malte

O malte é obtido a partir do processo de maltagem de grãos de cereais, geralmente cevada, mas também pode ser obtido a partir de trigo, centeio, aveia, arroz, sorgo ou *millet*.

Para iniciar o processo de maltagem, os cereais são imersos em água. A temperaturas mais elevadas a absorção da água é mais rápida, mas também favorece o crescimento microbiano. A temperatura deve ser controlada e mantida entre os 12 e 18 °C. À medida que o grão hidrata, aumenta 1,3 a 1,4 vezes o seu tamanho. Para evitar o compactamento, é soprado ar pela base, sendo o oxigénio rapidamente absorvido pelos grãos, mas também por microrganismos que competem com os grãos reduzindo a taxa de germinação.

Após ser atingido um determinado ponto de germinação, os grãos passam por uma secagem com ar quente de forma a interromper a germinação. O malte mais claro é obtido usando temperaturas mais baixas, por consequência a taxa de desnaturação das enzimas é menor. Usando temperaturas mais elevadas, os grãos ficam mais escuros, favorecendo a reação de Maillard, e a quantidade de enzimas ativas é menor. Em casos mais extremos, o malte é torrado, desnaturando todas as enzimas. As radículas formadas durante a germinação são removidas e o malte é armazenada até ser usado.

3.6.2 Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L.) é responsável pelo aroma, amargor e estabilidade microbiológica da cerveja, sendo um conservador natural. É cultivado na Alemanha, Estados Unidos e Nova Zelândia. É o cone feminino da planta que é usado, na forma de cone seco, óleo (resina) ou granulado (*pellet*).

Do ponto de vista da cerveja, o lúpulo possui 3 grupos de substâncias interessantes: a resina, os agentes de sabor e os polifenóis. A resina constitui cerca de 10-20% do peso do lúpulo seco, sendo essencialmente todos os compostos responsáveis pelo amargor, tais como os ácidos α e β . Os ácidos- α são convertidos a ácidos-iso- α durante a fervura enquanto que os ácidos- β possuem uma baixa solubilidade no mosto e na cerveja, contribuindo pouco para o amargor. Os agentes de sabor são óleos essenciais e correspondem a 0,4-2,0% do peso seco, responsáveis pelo aroma, tendo já sido identificados mais de 300 compostos. Quanto aos polifenóis constituem 4-14% do peso seco do lúpulo e estão diretamente relacionados com a qualidade da cerveja, podendo ter atividade antioxidante. O xantumul presente no lúpulo foi identificado como possível anticancerígeno.

A composição do lúpulo depende da variedade, do local de cultivo e das condições atmosféricas.

3.6.3 Levedura

As leveduras usadas na cerveja pertencem ao género *Saccharomyces* e podem ser divididas em dois grupos *ale* e *lager*. A levedura *S. cerevisiae* pertence às *ale*, de alta fermentação (entre os 15 e 24 °C) e a levedura *S. pastorianus* é *lager*, de baixa fermentação (entre os 3 e 11 °C) (White e Zainasheff, 2010). Essas gamas de temperatura podem ser diferentes dependendo das estirpes, sendo necessário ver a gama de temperatura sugerida pelo fornecedor.

Durante o processo de fermentação a levedura produz compostos com poder antioxidante. O dióxido de enxofre tem poder antioxidante, mas possui um aroma a fósforo queimado e a sua forma reduzida, sulfureto de hidrogénio, possui aroma a ovo podre, não sendo desejável sua presença no produto final. O dióxido de carbono libertado durante a fermentação arrasta a maior parte do sulfureto de hidrogénio para fora do fermentador.

O principal composto fenólico produzido pela levedura é o 4-vinil guaiacol que provém da descarboxilação do ácido ferúlico presente no malte. Esse composto fenólico possui um aroma a cravo, característico das cervejas de trigo. Para os restantes estilos de cerveja utilizam-se estirpes que possuem uma mutação natural no gene que codifica o enzima ácido ferúlico descarboxilase impedindo a conversão (White e Zainasheff, 2010).

3.6.4 Adjuntos

Os adjuntos são matérias-primas, não maltadas, que podem ser usados para aumentar o teor de açúcares fermentáveis, ou para melhorar alguma característica da cerveja, como por exemplo a formação e retenção da espuma, como por exemplo a aveia não-maltada, ou para adicionar sabor e cor, no caso da adição de frutas.

3.7 Processo de produção de cerveja

3.7.1 Moagem

O processo de produção de cerveja inicia-se com a moagem do grão. Essa etapa tem por objetivo quebrar o grão de cereal para aumentar a superfície de contato com as enzimas do malte e favorecer a hidrólise do amido tendo relação direta com o rendimento e eficiência dos processos seguintes.

3.7.2 Brassagem

Cerca de 10 a 15% dos extratos do malte são solúveis diretamente em água. Os restantes são da atividade enzimática da α -amilase e β -amilase. Essas enzimas degradam o amido em açúcares fermentáveis (maltose) e em dextrinas que não são fermentadas pelas leveduras utilizadas. As proteases degradam as proteínas em aminoácidos e péptidos e as fosfatases libertam o ião fosforo para o mosto. As reações enzimáticas são dependentes da temperatura e do pH. A combinação do tempo e da temperatura do patamar produz um perfil de açúcares que é fixado ao elevar a temperatura a 78 °C, desnaturando as enzimas. Esta elevação de temperatura também permite diminuir a viscosidade do mosto, facilitando o passo seguinte.

3.7.3 Filtração

A filtração tem por objetivo separar o mosto dos grãos. Geralmente é utilizada uma panela com fundo falso e com uma torneira na base. Inicialmente é feita uma recirculação do mosto, retirando da base da panela e regado o bolo que fica retido, de forma a clarificar o mosto. Assim que o mosto se encontra clarificado é transferido para a panela de fervura e os grãos são lavados com água a 70 °C para extrair os açúcares da camada de grãos restante.

3.7.4 Fervura

O mosto filtrado é fervido com os lúpulos, geralmente por 1-2 horas. A fervura do mosto permite uma estabilização biológica, ao inativar qualquer microrganismos no mosto, uma estabilidade bioquímica, desnaturando as enzimas, uma estabilidade físico-química, ao precipitar as proteínas desnaturadas e os polifenóis que se encontram complexados às proteínas, a extração e isomerização dos ácidos do lúpulo, contribuindo para o amargor e aroma, e concentração dos açúcares (aumento da densidade inicial).

3.7.5 Fermentação

As cervejas de alta fermentação (*ale*) são fermentadas a uma temperatura entre os 15 e 24 °C por leveduras *Saccharomyces cerevisiae* enquanto que as cervejas conhecidas como de baixa fermentação (*lager*) ocorre a temperatura mais baixa, entre 3 e 11 °C por leveduras *S. uvarum* e *S. pastorianus*.

O mosto contém como fonte de carbono glicose, frutose, sacarose, maltatriose e dextrinas. A principal fonte de azoto para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos provém da degradação de proteínas por proteases durante a brassagem. A aeração realizada na transferência do mosto para o tanque de fermentação, permite às leveduras produzirem ácidos carboxílicos insaturados e esteróis

importantes para a síntese da membrana celular, permitindo o crescimento celular. As leveduras utilizam a via fermentativa, consumindo os açúcares simples e produzindo etanol, dióxido de carbono e energia.

3.7.6 Maturação

Durante o período de maturação, também conhecida como fermentação secundária, a levedura que ainda se encontra em suspensão elimina alguns compostos indesejáveis do ponto de vista organolético, tal como aldeído, diacetilo e compostos sulfurosos (Briggs *et al.*, 2004).

Com a diminuição da temperatura de maturação, geralmente 0-5 °C, a levedura sedimenta e deposita-se no base do tanque de fermentação. A levedura pode ser recolhida e usada em outras fermentações subsequentes, até à sétima ou oitava geração. Nessas condições, os complexos proteína-polifenóis também precipitam diminuindo a turvação da cerveja, aumentando por consequência a estabilidade coloidal, mas diminuindo o poder antioxidante.

3.8 Cálculos cervejeiros

Para a formulação da receita geralmente recorre-se a programas como o *BeerSmith* que adiciona as especificações do equipamento e que possui uma alargada base de dados de informações sobre matérias-primas e respetivas especificações. Tornando-se prático para a formulação de receitas de cerveja (Escola Superior de Cerveja e Malte, 2019).

Estimativa da massa de malte necessário

Cada tipo de malte possui um potencial de densidade calculado a partir da densidade obtida da infusão de 1 libra de malte em 1 galão de água. Esse parâmetro relaciona a contribuição/capacidade de cada malte fornecer açúcares e por consequência aumentar a densidade do mosto. A humidade do malte e o poder enzimático (capacidade de converter o amido em açúcares fermentáveis) são outros parâmetros a ter em consideração. Um aumento da humidade e diminuição do poder enzimático baixam o potencial de densidade. Geralmente estes dados são fornecidos pelo fornecedor, caso contrário existem bases de dados com valores médios para cada tipo de malte (por exemplo *Grains, Extracts & Sugars* ou *BrewUnited's Grain Database*).

Além da quantidade de malte, deve-se ter em consideração que a conversão dos açúcares do malte não é total. Essa eficiência também depende do equipamento e da técnica de brassagem utilizada.

Estimativa da cor

A contribuição de cada malte para a cor da cerveja pode ser estimada recorrendo à de Morey (equação 9), em unidades de escala da *Standard Reference Method* (SRM). A cor da cerveja é a soma dos valores obtidos (Smith, 2010). Este parâmetro também pode ser apresentado em unidades da escala *European Brewery Convention* (EBC) (equação 10).

$$Cor (SRM) = 1,4922 \times \left(\frac{10 \times m_{malte}(kg) \times cor_{malte}(^{\circ}L)}{V (L)} \right)^{0,6859} \quad (9)$$

$$Cor (EBC) = Cor (SRM) \times 0,508 \quad (10)$$

Dosagem lúpulo

O tempo e a intensidade da fervura estão relacionados com a taxa de isomerização dos α -ácidos ($taxa_{convers\tilde{a}o}$). Os lúpulos possuem diferentes concentrações de α -ácidos que podem variar entre 2 a 18 % (m/m) ($\alpha_{l\acute{u}pulo}$).

O amargor da cerveja, em unidades da escala *International Bitterness Units* (IBU), pode ser estimado usando a equação 11 (Palmer, 2006).

$$IBU = \frac{m_{l\acute{u}pulo}(mg) \times taxa_{convers\tilde{a}o}(\%) \times \alpha_{l\acute{u}pulo}(\%)}{V_{mosto}(L)} \quad (11)$$

A taxa de conversão (tabela 1) é um fator de correção que depende da densidade do mosto e do tempo de fervura. Segundo Palmer (2006), a taxa de conversão dos α -ácidos em iso- α -ácidos decresce em mostos com densidades mais elevadas.

Tabela 1- Taxa de conversão em função do tempo de fervura e da densidade do mosto (Palmer, 2006).

Tempo de fervura (min)	Massa específica (g/mL)			
	1,030	1,040	1,050	1,060
0	0,000	0,000	0,000	0,000
5	0,055	0,050	0,046	0,042
10	0,100	0,091	0,084	0,076
15	0,137	0,125	0,114	0,105
20	0,167	0,153	0,140	0,128
25	0,192	0,175	0,160	0,147
30	0,212	0,194	0,177	0,162
35	0,229	0,209	0,191	0,175
40	0,242	0,221	0,202	0,185
45	0,253	0,232	0,212	0,194
50	0,263	0,240	0,219	0,200
55	0,270	0,247	0,226	0,206
60	0,276	0,252	0,231	0,211

3.9 Estilos de cerveja segundo o *Beer Judge Certification Program*

Beer Judge Certification Program (BJCP) é uma organização que publica diretrizes de estilo de cerveja de forma a padronizar as cervejas pelo mundo. Segundo a BJCP, os quatros estilos de cervejas produzidos neste estudo são descritos como (BJCP, 2015):

Pilsen (German Pils)

Uma *lager* muito clara, altamente carbonatada, de corpo leve e bem atenuada, com um perfil de sabor muito neutro e de baixo amargor (tabela 2).

Tabela 2- Características do estilo *Pilsen (German Pils)* (BJCP, 2015).

Parâmetros	Valor
Densidade original (OG)	1,044-1,050
Amargor (IBU)	22-40
Densidade final (FG)	1,008-1,013
Cor (SRM)	2-5
Álcool (ABV)	4,4-5,2 %

Catharina Sour

Este estilo é próximo de uma *Berliner Weisse* porém com extrato original mais alto e com maior teor alcoólico, sendo obrigatório usar fruta. É uma cerveja tipo trigo de alta fermentação, leve e refrescante com teor alcoólico médio e amargor imperceptível (tabela 3). O mosto é acidificado por *Lactobacillus*, destaca-se o aroma da fruta utilizada e permite o uso de especiarias. É utilizado malte de cevada e de trigo (maltado ou não). Permite o uso de aveia, cevada ou centeio em pequena quantidade, mas não permite o uso de maltes caramelos ou torrados. A levedura utilizada deve ser neutra.

Tabela 3- Características do estilo *Catharina Sour* (BJCP, 2015).

Parâmetros	Valor
Densidade original (OG)	1,039-1,048
Amargor (IBU)	2-8
Densidade final (FG)	1,002-1,008
Cor (SRM)	2-7
Álcool (ABV)	4,0-5,5%

American Strong Ale

Estilo que usa maltes claros e maltes Cristal tostado médio a escuro. Lúpulos americanos de perfil cítrico ou pinho. Geralmente utiliza uma levedura americana com atenuação mais alta (tabela 4).

Tabela 4- Características do estilo *American Strong Ale* (BJCP, 2015).

Parâmetros	Valor
Densidade original (OG)	1,062-1,090
Amargor (IBU)	50-100
Densidade final (FG)	1,014-1,024
Cor (SRM)	7-19
Álcool (ABV)	6,3-10%

Oatmeal Stout

Cerveja de alta fermentação, maltada, tostada (chocolate e café), escura e encorpada. Permite 5-20 % de aveia ou aveia maltada para tornar a cerveja mais encorpada e melhorar a complexidade de sabor. O lúpulo é utilizado principalmente para amargor (tabela 5).

Tabela 5- Características do estilo *Oatmeal Stout* (BJCP, 2015).

Parâmetros	Valor
Densidade original (OG)	1,045-1,065
Amargor (IBU)	25-40
Densidade final (FG)	1,010-1,018
Cor (SRM)	22-40
Álcool (ABV)	4,2-5,9%

3.10 Colorimetria

Em cerveja, é usual apresentar a cor em unidades EBC, que se baseia numa escala unidimensional com 1 grau de liberdade. Esta escala vai do amarelo claro ao preto, não estando representadas as restantes cores como o vermelho, por exemplo. A análise tridimensional da cor da cerveja permite ter um método alternativo de análise mas também oferece dados mais representativos da percepção da cor e diferenças de cor, comparados com o método unidimensional.

Em 1931, foi criada a Comissão Internacional de L'Eclairage (CIE) que desenvolveu em 1976 o sistema CIELAB, um sistema que utiliza coordenadas geométricas, que por meio de medições espectrofotométricas e equações matemáticas, descrevem uma cor no espectro de luz visível. Os parâmetros utilizados são L^* , a^* e b^* , em que a coordenada L^* representa a luminosidade, que varia de zero (tons menos luminosos, preto) a 100 (tons mais luminosos, incolor) enquanto que as coordenadas a^* e b^* correspondem às cores. A coordenada a^* varia entre -80 (cor verde) a +100 (cor vermelha) e coordenada b^* varia entre -50 (tons azuis) a +70 (tons amarelos).

A quantificação da cor é de grande importância para o desenvolvimento de produtos e controlo de qualidade, podendo ser correlacionados com outros parâmetros em estudo. Em alimentos com mirtilo, a cor vermelha é dependente das antocianinas e das suas características tais como a estrutura, estabilidade, concentração assim como das condições do meio, pH, temperatura e presença de copigmentos (polifenóis, ácidos orgânicos, aminoácidos) que podem intensificar e estabilizar as antocianinas (Mazza e Miniati, 1993).

3.11 Envelhecimento

O envelhecimento de cerveja constitui um fator importante na indústria cervejeira. Avaliando a consistência das características do produto ao longo do tempo permite definir o prazo de validade do produto. O envelhecimento forçado expõe o produto a temperaturas mais elevadas, aumentando a velocidade das reações de envelhecimento obtendo assim uma matriz com características semelhantes ao envelhecimento natural mas num tempo reduzido.

Li *et al.* (2015), correlacionaram a temperatura a que o produto é exposto com um fator de aceleração de envelhecimento, baseado nas alterações organolépticas das cervejas. Os resultados

demonstraram que uma cerveja mantida a 50 °C acelera em 30 vezes o envelhecimento da matriz do produto comparando com o das cervejas mantidas a temperatura ambiente (variando entre 20 e 30 °C).

4 Material e métodos

4.1 Insumos

Os maltes Pilsen (Agraria), Pale Ale (Agrária) e Trigo Claro (Agraria), Carapils (Weyermann), Crystal, Chocolate (Weyermann), Cevada Torrada (Château), os lúpulos Mosaic (11,3 % α -ácido) e Amarillo (7,2 % α -ácido) em *pellet* (Barth-Haas Group), as leveduras *American Ale* (*S. cerevisiae*) e *American Lager* (*S. uvarum*) (LEVTECK), as leveduras US-05 (*S. cerevisiae*) e T-58 (*S. cerevisiae*) (Fermentis) e a bactéria *Lactobacillus brevis* (LEVTECK) foram adquiridos na loja Ponto do Malte (Florianópolis, Brasil). Foi adquirido mirtilo integral congelado da empresa Vânio Morangos (Águas Mornas, Brasil). A gelatina alimentar sem sabor (Royal) e álcool de cereais 96 % (v/v) (Quimidrol) foram adquiridos no comércio local.

4.2 Químicos

1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), Trolox, reagente Folin-Ciocalteu e 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) foram adquiridos na Sigma-Aldrich. Carbonato de sódio anidro P.A., ácido gálico P.A., ácido clorídrico 37 % P.A. e cloreto de ferro III anidro P.A. foram adquiridos na Neon. Iso-octano P.A. e ácido láctico (84,5-85,5 %) P.A. proveniente da Vetec. Para a sanitização foi utilizada uma solução de 1 g/L de PAC 200 (ADPRO).

Foi utilizada água da rede municipal fornecida pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN). As informações da qualidade da água do mês de Março 2019 apresentadas pela empresa encontram-se no anexo A1.

4.3 Experimentos

Os experimentos para detetar o poder antioxidante do mirtilo em cervejas artesanais foram desenhados aplicando um planeamento fatorial 2^2 , o que envolve dois fatores (X_1 e X_2) em dois níveis (-1 e +1), o que resulta em 4 ensaios. O fator X_1 foi relacionado com um parâmetro da cerveja enquanto que o fator X_2 encontra-se relacionado com o mirtilo. Dessa forma foi somado 1 controlo para cada nível do fator X_1 , no qual não se adicionou mirtilo, totalizando 6 ensaios para cada experimento. As variáveis dependentes observadas foram a atividade antioxidante medida através de três métodos (DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu). Na tabela 2 são apresentadas as faixas de valores codificados do planeamento experimental.

Tabela 6-Matriz do delineamento experimental com valores codificados (X_1 e X_2).

Ensaio	X_1	X_2
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
Controlo 1	-1	-
Controlo 2	+1	-

- Experimento 1: Estudo realizado com cerveja do estilo *Pilsen*. X_1 correspondeu à temperatura dos 3 primeiros dias de maturação após a adição de mirtilo, sendo o nível inferior (-1) 5 °C e o nível superior (+1) a temperatura ambiente (18-25 °C). X_2 correspondeu a quantidade de mirtilo de 5% (-1) e 10% (+1). A escolha do fator X_1 teve como objetivo avaliar se a adição do mirtilo deve ser feita à temperatura de fermentação ou à temperatura de maturação, observando se existe degradação de antioxidantes a temperatura de fermentação. Para este estudo inicial, foi selecionado o estilo *Pilsen* por ser o estilo mais consumido e conhecido dos consumidores.
- Experimento 2: Estudo realizado em cerveja do estilo *Catharina Sour*, onde X_1 correspondeu aos valores de pH 3,9 (-1) e 3,4 (+1), e X_2 correspondeu ao modo de adição do mirtilo: com cascas (70% sumo e 30% cascas) (-1) e sem cascas (100 % sumo) (+1). Por serem cervejas acidificadas com *Lactobacillus*, é relevante estudar o efeito do pH do poder antioxidante neste estilo.
- Experimento 3: Estudo realizado em cerveja do estilo *American Strong Ale*. X_1 correspondeu ao efeito do teor alcoólico, sendo o nível inferior (-1) 5,5% (v/v) e o nível superior (+1) 7,7% (v/v). O aumento da graduação alcoólica foi alcançado com a adição de 100 mL de álcool de cereais 96% ao volume de 4 L de cerveja. X_2 correspondeu ao uso de mirtilo congelado (-1) ou tratado termicamente (+1) (ver 4.5 *Processamento do mirtilo*). De modo geral, os estilos *Strong* possuem um teor alcoólico mais elevado e com uma gama mais ampla, tendo sido selecionado o estilo *American Strong Ale* para avaliar a influência desse parâmetro no produto final.
- Experimento 4: Estudo realizado em cerveja do estilo *Oatmeal Stout*. X_1 correspondeu ao processo de clarificação da cerveja 24h antes do engarrafamento, utilizando 0,3 g/L de gelatina (-1) e sem adição de gelatina (+1). X_2 correspondeu a adição de mirtilo na maturação (-1) ou no engarrafamento (+1). Este experimento teve como objetivo estudar o poder antioxidante numa cerveja escura, tendo sido escolhido o estilo *Oatmeal Stout*. A adição de aveia contribui para um aumento do conteúdo proteico sendo relevante avaliar este fator neste experimento, adicionando gelatina para reduzir a concentração das proteínas em suspensão e avaliar o seu impacto na atividade antioxidante.

Tabela 7- Resumo do planejamento fatorial 2² dos experimentos. Sendo X₁ o fator relacionado com a cerveja e X₂, o fator relacionado com a adição do mirtilo, desdobrados em dois níveis: inferior (-1) e superior (+1). A-Experimento 1 (*Pilsen*); B-Experimento 2 (*Catherina Sour*); C-Experimento 3 (*American Strong Ale*); D-Experimento 4 (*Oatmeal Stout*).

A		T (°C) 3 primeiros dias de maturação		Quantidade (% m/v)				
		X ₁		X ₂				
Nível	-1	5	5	C	Álcool (% v/v)	Processamento do mirtilo		
	+1	18	10		X ₁	X ₂		
Nível	-1	5,5	Congelado	Nível	-1	5,5	Congelado	
	+1	7,7	Térmico		+1	7,7	Térmico	
B		Acidez		Cascas vs. sumo				
		X ₁		X ₂				
Nível	-1	3,9	30% casca e 70% sumo	D	Clarificação		Etapa de adição do mirtilo	
	+1	3,4	100% sumo		X ₁	X ₂		
Nível	-1	Com	Maturação	Nível	-1	Com	Maturação	
	+1	Sem	Engarrafamento		+1	Sem	Engarrafamento	

4.4 Produção da cerveja

Para cada ensaio, foi realizada uma ficha técnica com toda a informação detalhada das matérias-primas, tempos, temperaturas e pH das diferentes etapas da produção do mosto. Considerou-se uma eficiência de brassagem de 75 % nas formulações (ver anexo A2). O mosto foi produzido num sistema de três painéis de 45 L (figura 1). Nesse sistema, a primeira panela serviu a brassagem e possuía uma torneira acoplada um a filtro cilíndrico para a etapa de filtração. A segunda panela foi utilizada para ter água a 70 °C para a lavagem dos grãos e a terceira panela foi utilizada para a recolha do mosto e posterior fervura.



Figura 1-Sistema de três painéis para a produção do mosto. Legenda: 1-Panela de fervura; 2-Panela de brassagem; 3-Panela de água 70 °C; 4-Fonte de calor (fogão a gás); 5-Botija de gás propano.

Após os 60 minutos de fervura com os lúpulos adicionados segundo a formulação (anexo A2), o mosto foi arrefecido até 25 °C usando uma serpentina de inox, com circulação de água de torneira. A serpentina foi colocada no mosto 10 min antes do final da fervura para sua esterilização. No caso do Experimento 2, foi realizada uma fervura de 5 min sem a adição de lúpulo. O mosto foi de seguida arrefecido até 37 °C, acidificado com ácido láctico até pH 4,5 e inoculado *Lactobacillus brevis* (segundo a recomendação do fornecedor, ver Anexo A4) na panela de fervura. A panela foi selada com filme de plástico e colocada sobre uma placa de aquecimento (*Tecna! TE-085*) a 10 % de potência, de forma a manter a temperatura de próxima dos 37 °C. Esta técnica é conhecida como *kettle sour*. Ao fim de 36 h, foi atingido um pH de 4,0. O mosto foi fervido durante 20 min e adicionado o lúpulo segundo a formulação (ver Anexo A2) e arrefecido até 25 °C.

A fermentação primária foi realizada num fermentador de inox (50 L) com controlador de temperatura (figura 2) onde foram inoculadas as leveduras (ver Anexo A2). Após 7 dias de fermentação, a cerveja foi dividida em volumes de 4 L e aplicadas as condições descritas no planeamento experimental (ver 4.3 Experimentos). A maturação da cerveja teve a duração de 14 dias a 5 °C.



Figura 2-Fermentador de inox 50 L com controlo de temperatura (Novus N480D) (temperatura de operação 0 a 25 °C) utilizado para a fermentação primária.

4.5 Processamento do mirtilo

O mirtilo foi condicionado em saco plástico no congelador a -18 °C. Parte dele foi aquecida a 70 °C durante 10 min e de seguida arrefecido a 25 °C. Filtrou-se o preparado com um coador metálico cónico e usou-se o sumo do mirtilo. Esse processamento teve 50% de rendimento em massa de sumo em relação à massa de mirtilo congelado. No Experimento 2, no nível -1 do fator X_2 foi adicionado todo fruto (sumo, casca e sementes). No caso do Experimento 3, adicionou-se mirtilo sem tratamento térmico, apenas processado num liquidificador (*Britania* modelo *Diamante Black Filter*) durante 5 min à potência máxima, correspondendo ao nível -1 do fator X_2 .

4.6 Engarrafamento

Após o final da maturação, a cerveja foi colocada em garrafas de vidro sanitizadas de cor âmbar com 5 g/L de glicose e mantido à temperatura ambiente por 7 dias para carbonatar, num ambiente seco e ao abrigo da luz. Após a refermentação em garrafa, o produto final foi analisado segundo os métodos descritos a seguir.

4.7 Ensaio DPPH

Esse método de quantificação de atividade antioxidante é baseado no decréscimo da absorvância a 517 nm na captura do radical 1,1-Difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) pelos antioxidantes presentes na amostra. A metodologia é baseada no método descrito por Brand-Williams et al. (1995) com algumas modificações. Foi preparada uma solução de DPPH (10×10^{-5} M) em etanol 50 % e foi medida a absorvância de 2,9 mL da solução de DPPH (A_0) e na sequência adicionado 100 μ L da amostra diluída (1:2) em etanol (50%). A segunda leitura foi realizada após um tempo de repouso de 30 min no escuro (A_{30}). A percentagem de inibição foi calculada pela equação 12.

$$\% \text{ inibição DPPH} = \left[1 - \left(\frac{A_{30}}{A_0} \right) \right] \times 100 \quad (12)$$

A curva de calibração foi construída com o padrão Trolox e os resultados expressos em milimol de Trolox equivalente por litro de cerveja (TE mmol/L) (anexo A3).

4.8 Ensaio FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

A pH baixo, a redução do complexo ferro-tripiridiltrianzina (Fe(III)-TPTZ), que possui uma coloração azul, é seguida pelo decaimento da absorvância a 620 nm. Em tubos de ensaio 200 μ L da amostra diluída (1:2) e 200 μ L de FeCl₃ (3 mM) foram misturados e mantidos durante 30 min em banho-maria a 37 °C. Em seguida foi adicionado 3,6 mL de uma solução de TPTZ (10 mM em 50 mM HCl) e deixado em repouso por 10 min antes de realizar a leitura (Benzie e Strain, 1996). A curva de calibração foi traçada usando Trolox e os resultados obtidos forma expressos em milimol de Trolox equivalente por litro de cerveja (TE mmol/L) (anexo A3).

4.9 Compostos fenólicos

A determinação dos compostos fenólicos totais foi baseada no método de Folin-Ciocalteu de acordo com Singleton e Rossi (1965) com modificações propostas por Zhao et al (2010). A 0,1 mL de amostra diluída (1:2) foi adicionado 7,9 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu e deixado reagir por 3 min no escuro. Após o repouso, 1,5 mL de Na₂CO₃ 20 % foi adicionado, a mistura foi agitada e a reação decorreu durante 2 h no escuro à temperatura ambiente. O reagente de Folin-Ciocalteu contém molibdato de sódio e tungstato que reagem com qualquer tipo de fenol. A transferência de elétrões a pH básico reduz o molibdato de sódio e o tungstato em óxidos de tungstênio (W₈O₂₃) e molibdênio (Mo₈O₂₃), que possuem cor azul, sendo a leitura realizada no espectrofotômetro a 760 nm. A curva padrão foi construída com ácido gálico com as concentrações 0, 100, 250, 500 e 750 mg/L e os resultados expressados em miligramas de ácido gálico equivalente por litro de cerveja (mg GAE/L) (anexo A3).

4.10 Determinação de cor

A cor das cervejas controlo foi determinada por meio da leitura da absorvância a 430 nm contra água destilada. A cor pode ser expressa em unidades SRM (*Standard Reference Method*) (equação 13). F_c é o fator corretivo uma vez que é usada uma célula espectrofotométrica de 1 cm em vez de ½ polegada (FC=1,27) (Covenin, 2001). Sendo os resultados apresentados em unidades EBC usando a equação 10 por ser mais usual na indústria cervejeira.

$$Cor (SRM) = Abs \times 10 \times F_c \quad (13)$$

A determinação da cor das restantes cervejas foi realizada adicionando uma amostra numa célula de 30 mL de quartzo num colorímetro *Konica Minolta CR-400* com leitura direta dos valores das coordenadas do sistema CIELAB: L* (luminosidade), a* (vermelho, verde) e b*(amarelo, azul). A partir desses valores é possível determinar os parâmetros de tonalidade (h*) e saturação (C*) usando as equações 14 e 15, respetivamente.

$$h^* = \arctan\left(\frac{a^*}{b^*}\right) \quad (14)$$

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad (15)$$

A diferença de cor entre as cervejas com a adição de mirtilo e as respectivas cervejas controlo (ΔE^*) foi calculado a partir da equação 16.

$$\Delta E^* = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad (16)$$

4.11 Amargor

A determinação do amargor foi realizada a partir de uma extração líquido-líquido dos α -ácidos isomerizados na forma iso- α -ácidos com o solvente iso-octano. Uma amostra de 5,0 mL de cerveja descarbonatada foi adicionada num tubo de Falcon de 50 mL com 0,5 mL de HCl 3N e 10 mL de iso-octano. O tubo foi agitado num vortéx e centrifugado a uma velocidade de 400 x g durante 3 min. Para ajudar a separar as fases, o tubo foi batido na bancada e realizada uma segunda centrifugação durante 5 min. Caso as fases ainda não estivessem separadas realizava-se uma terceira centrifugação. A absorvância da fase superior foi lida num espectrofotómetro a 275 nm (A_{275}) e o valor convertido em unidades IBU usando a equação 17 (ASBC, 2018).

$$IBU = A_{275} \times 50 \quad (17)$$

4.12 Densidade

A densidade relativa (a 20 °C) foi determinada com recurso a um picnómetro com volume de 30 mL. Nesse método foram pesados o picnómetro vazio, com água destilada e com amostras (equilibradas a 20 °C). A densidade relativa (a 20 °C) pode ser determinada com recurso à equação 18. A densidade inicial e a densidade final foram determinados com recurso a um densímetro.

$$Densidade\ relativa\ (20^\circ C) = \frac{massa_{picnómetro\ com\ amostra} - massa_{picnómetro\ vazio}}{massa_{picnómetro\ com\ água} - massa_{picnómetro\ vazio}} \quad (18)$$

4.13 Álcool

Para estimar o teor alcoólico das cervejas recorreu-se à equação 19 (Maskell *et al.*, 2017).

$$\text{Álcool } (\% v/v) = (Densidade\ inicial - Densidade\ final) \times 131,25 \quad (19)$$

4.14 Proteínas

O conteúdo proteico final das cervejas foi determinado por um método alternativo utilizado pela *American Society of Brewing Chemists* (ASBC) (ASBC, 2005). Uma amostra da cerveja descarbonatada (6 mL) é adicionada num Erlenmeyer tarado numa balança digital de precisão e o seu peso (w_1) registado. A amostra foi diluída com 1,000 mL de água destilada e registado o seu novo peso (w_2) da amostra diluída. A solução foi agitada e a absorvância medida num espectrofotómetro a 215 nm (a_{215}) e a 225 nm (a_{225}) usando água destilada como branco. O conteúdo proteico (% mássica) foi calculado recorrendo às equações 20-23, específica para cervejas claras não estabilizadas, e às equações 20-22 e 24 para cervejas escuras.

$$A_{215} = \frac{w_2}{w_1} \times a_{215} \quad (20)$$

$$A_{225} = \frac{w_2}{w_1} \times a_{225} \quad (21)$$

$$\Delta A = A_{215} - A_{225} \quad (22)$$

Para cervejas não estabilizadas:

$$\text{Proteína (\% mássica)} = 0,00982 \times \Delta A + 0,000029 \times \Delta A^2 \quad (23)$$

Para cervejas escuras:

$$\text{Proteína (\% mássica)} = (0,0107 \times A_{215}) - (0,0115 \times A_{225}) + 0,00003 \times \Delta A^2 \quad (24)$$

Baseado no estudo colaborativo (ASBC, 2005), os coeficientes de repetitividade e reprodutibilidade são 4,6% e 2,2-5,8%, respetivamente, num intervalo proteico de 0,26-0,48 % mássico.

4.15 Açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi baseada no método proposto por Miller (1959). Foram adicionados num eppendorf de 2 mL 0,6 mL de reagente DNS e 0,6 mL da amostra de cerveja. A mistura foi aquecida a 95 °C durante 5 min (Eppendorf ThermoStat Plus) e então adicionado 0,2 mL de uma solução de tartarato de sódio 0,4%. De seguida, a mistura foi arrefecida até à temperatura ambiente e a absorvância medida a 575 nm. A curva de calibração é realizada com soluções padrão de glicose (anexo A3).

4.16 Concentração de sólidos totais

Uma amostra de 20 mL de cerveja foi aquecida em banho-maria a 100 °C até a aparente secagem. Em seguida, levou-se para a estufa a 105 °C por 1 hora e pesou-se. A concentração de sólidos totais foi calculada utilizando a Equação 25 (IAL, 2008).

$$\frac{100 \times P}{V} = \text{Sólidos totais \% (m/V)} \quad (25)$$

P = massa do resíduo, em g

V = volume da amostra em mL

4.17 Acidez total titulável

Uma amostra de 10 mL de cerveja descarbonatada foi adicionada num Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de água. A titulação foi realizada com solução de hidróxido de sódio padronizada 0,1N até ao ponto de viragem (pH 8,2-8,4), (IAL, 2008). A acidez total titulável calculada pela equação 23 é expressa em gramas de ácido acético/100 mL de amostra.

$$\text{Acidez total titulável} = \frac{6 \times V_{\text{gasto}} \text{ (mL)}}{100} \quad (23)$$

4.18 Quantificação de antocianinas

O teor de antocianinas presente na amostra foi determinado a partir da medição da absorvância a dois comprimentos de onda, 520 nm e 700 nm, em duas soluções tampão com pH de 1,0 e pH 4,5 (Lee *et al.*, 2005). As antocianinas degradadas encontram-se na forma polimerizada, e são resistentes à mudança de cor em diferentes valores de pH, assim não são contabilizadas por este método.

A solução tampão pH 1,0 foi preparada a partir de uma solução de cloreto de potássio 0,025 M e o pH ajustado com HCl. A solução tampão pH 4,5 foi preparada com uma solução de acetato de sódio 0,4 M e o pH ajustado com HCl. Adicionaram-se 5 mL da amostra a 20 mL da solução tampão pH 1,0 num tubo de ensaio e misturado num vórtex. O mesmo procedimento foi realizado com a solução tampão pH 4,5. Foram lidas as absorvâncias de ambas as misturas a 520 nm e 700 nm. A quantidade de antocianinas foi determinada recorrendo à equação 24. O resultado foi expresso em miligramas equivalente de cianidina-3-glicosídeo por litro (equação 24).

$$\text{Antocianinas} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \frac{[(Abs_{520 \text{ nm}} - Abs_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1,0} - (Abs_{520 \text{ nm}} - Abs_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}] \times D \times Mm \times 10^3}{\epsilon \times L} \quad (24)$$

Sendo:

D: Fator de diluição

Mm: Massa molar cianidina-3-glicosídeo (cyanidin-3-glucoside) (449,2 g.mol⁻¹)

ϵ : Coeficiente de extinção molar cianidina-3-glicosídeo (cyanidin-3-glucoside)
(26900 L.mol⁻¹.cm⁻¹)

L: Percurso ótico (1 cm)

4.19 Envelhecimento

O envelhecimento natural foi analisado após 2 meses de armazenamento nas cervejas estilo *Lager*, produzidas no Experimento 1. Essas cervejas foram selecionadas devido à limitação de tempo deste projeto, pois foram as primeiras cervejas produzidas. Duas garrafas de cada cerveja foram mantidas num local escuro à temperatura ambiente (entre 18 e 25 °C) e outras duas garrafas de cada cerveja foram mantidas a 5 °C num frigorífico.

As cervejas do Experimento 3 foram submetidas a um envelhecimento forçado durante 7 dias numa incubadora *Marconi MA 410 CFT* a uma temperatura de 50 °C, sem agitação, devolvendo uma matriz semelhante a uma cerveja com 7 meses.

Após o período de envelhecimento natural e forçado, o poder antioxidante foi novamente avaliado pelos métodos DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu e comparadas com os resultados obtidos anteriormente, sendo os resultados apresentados em percentagem de decaimento para cada método (equação 28).

(28)

$$Decaimento (\%) = \frac{Produto_{Envelhecido} - Produto_{Acabado}}{Produto_{Envelhecido}} \times 100$$

4.20 Análise microbiológica

Foi realizado uma avaliação microbiológica do produto final de forma a garantir que não houve contaminação. Essa avaliação foi realizada pelo teste de Gram e observação direta no microscópio.

4.21 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada com provadores não treinados consumidores de cerveja, num espaço (Figura 3) cedido pela cervejeira Kairós, o bar Hora K localizada na cidade de Florianópolis, Santa Catarina (Brasil).

Foram submetidas a esta análise as quatro cervejas com mirtilo do Experimento 2 (*Catharina Sour*), sendo excluídas as cervejas controlo. As cervejas foram divididas em dois grupos (Tabela 8), sendo que cada provador analisou uma cerveja de cada pH e uma cerveja com e sem adição da casca do mirtilo. Devido à ligação histórica entre o estilo *Catharina Sour* e Florianópolis, essas cervejas foram consideradas mais pertinentes para a realização da análise sensorial.

Tabela 8- Características das cervejas de cada grupo submetidas à análise sensorial e o respetivo valor código (entre parêntesis).

Grupo 1	Grupo 2
pH=3,9 e 100% sumo (473)	pH=3,9 70% sumo + 30 % casca (671)
pH=3,4 70% sumo + 30 % casca (254)	pH=3,4 100% sumo (134)

Os provadores receberam previamente a informação que iriam analisar duas amostras de cerveja do estilo *Catharina Sour* com adição de mirtilo. Aos provadores que não conheciam o estilo, foi dado uma breve informação sobre a história e características gerais do estilo, como sendo uma cerveja mais ácida que a cerveja “comum” (estilo *Pilsen*), e com a presença obrigatória de fruta. Para os provadores que não conheciam o mirtilo também foi entregue uma baga da fruta para provar antes da análise sensorial. Os provadores também receberam uma breve orientação sobre como realizar a análise sensorial. Foi sugerido analisar em primeira instância a cor, de seguida analisar o aroma e por fim o sabor.

A análise sensorial contou com 34 provadores (n=34; 18 do sexo masculino e 16 do sexo feminino) não treinados com idade variando entre 19 e 62 anos, sendo a média de idades de 31 anos. Cada provador analisou e avaliou a impressão global das duas amostras segundo (ver Anexo A6):

- A aparência/cor, o aroma, o sabor e o corpo segundo uma escala hedónica de 9 classificações entre 1 (Desgostei muitíssimo) e 9 (Gostei muitíssimo);
- A preferência segundo uma escala *Just-About-Right* (JAR) com 5 classificações quanto à perceção da fruta e à acidez;

- Três perguntas relacionadas com a segmentação do mercado (o hábito de consumo do estilo, cerveja com poder antioxidante e cerveja com produtos regionais).

Foram entregues 15 mL de cada amostra numa taça de cristal com uma codificação aleatória de três dígitos.



Figura 3-Cabines para a análise sensorial (espaço cedido pela cervejeira Kairós, Florianópolis, Brasil).

4.22 Análise estatística

As determinações do poder antioxidante e compostos fenólicos foram realizadas em triplicatas e as restantes em duplicatas sendo os resultados apresentados com os desvios padrões respetivos. Os resultados foram analisados com recurso ao software *Excel* e *Statistica 7.0* com a ferramenta *ANOVA* para a análise de variância dos resultados das variáveis dependentes em cada experimento, com nível de confiança de 95%. Uma análise pelo diagrama de Pareto permite de forma rápida e clara avaliar os efeitos que são estatisticamente importantes. Apenas os efeitos cujos retângulos estiverem à direita da linha divisória ($p=0,05$) foram considerados. Um efeito com valor positivo indica que a resposta é aumentada pelo fator do nível inferior (-1) para o nível superior (+1) e um valor negativo indica uma inversão do efeito. Quanto maior o valor absoluto do efeito, maior é o impacto do fator na resposta.

A análise das componentes principais (PCA) foi conduzida para confirmar a existência de correlações entre as variáveis analisadas. PCA foi realizada usando o *software Statistica 7* com a utilização dos valores médios das 24 amostras e de 14 variáveis (DPPH, FRAP, compostos fenólicos, proteínas, acidez titulável, pH, densidade relativa, sólidos totais, antocianinas, açúcares redutores álcool e as três coordenadas de colorimetria (L^* , a^* e b^*)).

5 Resultados e discussão

À exceção das cervejas do Experimento 2 (*Catharina Sour*), o estilo das outras cervejas tecnicamente não permite a adição de fruta de acordo com o guia de estilos BJCP (BJCP, 2015). Para termos comparativos com as diretrizes propostas pela BJCP, consideraram-se características das cervejas controlo (sem adição do mirtilo). Assim, os resultados das densidades iniciais e finais, da cor, do amargor e do teor alcoólico estimado das cervejas controlo estão apresentados na tabela 9. Foi também medido a densidade após a brassagem de forma a conhecer o rendimento experimental do equipamento nessa etapa (valor devolvido pelo simulador).

Tabela 9 - Resumo dos parâmetros das amostras de cervejas controlo dos Experimentos.

Experimento	1	2	3	4
Estilo	<i>Pilsen (German Pils)</i>	<i>Catharina Sour</i>	<i>American Strong Ale</i>	<i>Oatmeal Stout</i>
Densidade do mosto após brassagem	1,056	1,046	1,052	1,058
Rendimento da Brassagem (%)	79	72	70	78
Densidade inicial	1,058	1,047	1,055	1,062
Densidade final	1,011	1,010	1,013	1,020
Álcool estimado (% v/v)	6,2	4,9	5,5	5,5
Atenuação (%)	81	79	76	68
Cor (EBC)	6	6	7	70
Amargor (IBU)	22	6	52	34

O rendimento da brassagem variou entre os 70 e os 79%, sendo próximo do rendimento pressuposto na formulação das receitas (75%). Na produção de cerveja artesanal é necessário ter o conhecimento experimental do equipamento utilizado de forma a conhecer os parâmetros operacionais, como por exemplo o rendimento da brassagem, as perdas por evaporação na fervura, o calor específico das panelas e as perdas no fermentador. Quanto mais parâmetros forem inseridos no software de simulação cervejeiro (*BeerSmith*) melhor será a previsão das características da cerveja.

O rendimento da brassagem do Experimento 1 foi de 79% e a densidade inicial de 1,058, sendo esse último valor superior ao valor recomendado para o estilo *Pilsen*, que é 1,050. Essa diferença deve-se ao fato do rendimento da brassagem ter sido superior ao estimado na formulação da receita e provavelmente também à taxa de evaporação ter sido mais elevada. Por não se conhecer essa taxa, foi utilizada a taxa padrão do simulador de 5% (v/v)/h. Também se observa que o amargor da cerveja foi inferior em 4 IBU ao estimado pela receita, ou seja a isomerização dos ácidos- α do lúpulo foi inferior ao previsto. Tal como descreve Palmer (2006), a taxa de conversão da isomerização diminui com o aumento de densidade para o mesmo tempo fervura (tabela 1). Quanto à cor, foi obtido o valor previsto (6 EBC).

Em relação ao Experimento 2, a densidade inicial teve uma diferença de 0,001 ao previsto, enquanto que a cor e o amargor foram atingidos. Essa diferença reduz 0,1% (v/v) o teor alcoólico da cerveja, mas não exclui a cerveja do estilo.

No caso do Experimento 3, o rendimento foi de 70% sendo inferior aos 75 % previstos. A densidade inicial foi de 1,052, inferior ao adequado para o estilo (1,062). Nesse caso houve uma menor extração de açúcares dos grãos de cereais e por consequência a densidade inicial foi menor ao previsto pela receita. Por consequência o amargor foi superior de 2 IBU. A cor atingida foi de 6 EBC que era o previsto.

Tal como no Experimento 1, a brassagem da cerveja *Oatmeal Sout* (Experimento 4) obteve um rendimento e uma densidade inicial superior ao previsto. Nessa brassagem, o amargor teve uma diferença de 2 IBU inferior. Em relação à cor foi obtida uma diferença de 4 EBC superior à formulação.

As densidades finais dependem das leveduras utilizadas (estirpe, viabilidade celular, concentração de células) e das condições experimentais (oxigênio dissolvido, temperatura). Neste trabalho não se analisou a viabilidade celular das leveduras nem se fez a contagem das células, seguindo-se as recomendações do fornecedor (anexo A4). Esses fatores influenciam a atenuação da levedura e, por consequência, o valor da densidade final. Apenas a densidade final da cerveja do Experimento 1 se enquadrou no intervalo definido para o estilo (1,008-1,013). As cervejas dos Experimentos 2 e 4 ficaram ambas com uma densidade final superior em 0,002 recomendado. A cerveja do Experimento 3 teve uma densidade final inferior em 0,001 previsto para o estilo.

No âmbito deste trabalho, essas diferenças não invalidam os resultados obtidos do estudo fatorial. Uma cerveja encontra-se dentro de um determinado estilo quando cumpre os requisitos propostos pela BJCP no seu guia de estilos. Essas diretrizes foram criadas para agrupar as cervejas que se foram popularizando pelo mundo, não sendo obrigatório associar o nome do estilo proposto pelo BJCP à cerveja. Uma *Pilsen* é designada vulgarmente de uma cerveja “loira” e por exemplo uma *Stout* de “preta”. Essa terminologia pode levar a confusões, uma vez que existem diferentes cervejas escuras com características distintas, não dando informação suficiente ao consumidor. Com o aumento da cultura cervejeira e diversidade de estilos no mercado, o consumidor tem vindo a familiarizar-se com determinadas com os nomes dos estilos. Essa terminologia proposta pelo BJCP tem vindo a ser usado pela maioria das cervejeiras artesanais, indicando ao consumidor o que pode esperar da cerveja quanto ao amargor e à cor, por exemplo. Em concurso que se baseiam nas diretrizes do BJCP é necessário cumprir é as recomendações do guia para ter um termo de comparação entre as cervejas.

5.1 Experimento 1

Neste Experimento o fator X_1 corresponde à temperatura da cerveja dos três primeiros dias após a adição do mirtilo no fim da fermentação primária. No nível -1 o mirtilo foi adicionado a 5 °C (que corresponde à temperatura de maturação) e no nível +1 o início da maturação foi realizada à temperatura ambiente (18-25 °C).

A figura 4 apresenta o resultado de atividade antioxidante pelos três métodos propostos, observadas nas cervejas finais do Experimento 1. É possível observar que os resultados de

concentração equivalente de Trolox, medido pelo método DPPH, foram aproximadamente duas vezes superiores aos valores detetados pelo método FRAP. Analisando o gráfico de Pareto que ordena os fatores significativos (figura 5), é possível concluir que o aumento da quantidade de mirtilo (X_2) de 5% para 10% teve um impacto positivo e significativo ($p < 0,05$) na atividade antioxidante medida pelo método DPPH e pelo método FRAP, assim como na quantidade de compostos fenólicos. Por outro lado, o aumento da temperatura de maturação dos três primeiros dias (X_1) aumentou de forma significativa apenas a quantidade de compostos fenólicos (figura 5C). Segundo estes resultados, seria recomendável selecionar 10% (m/v) de mirtilo e a temperatura de 18 °C para os três primeiros dias de maturação. Mas é necessário ter em consideração que combinação desses dois fatores tem um impacto negativo na atividade medida pelo método FRAP (figura 5B). Com os dados obtidos não é possível concluir quais as condições ótimas considerando estes dois fatores, seria necessário realizar um planejamento fatorial com 2 fatores mas com mais níveis, por exemplo o ponto central, de forma a obter um modelo e analisar quais poderiam ser as condições que maximizam o resultado dos dois métodos.

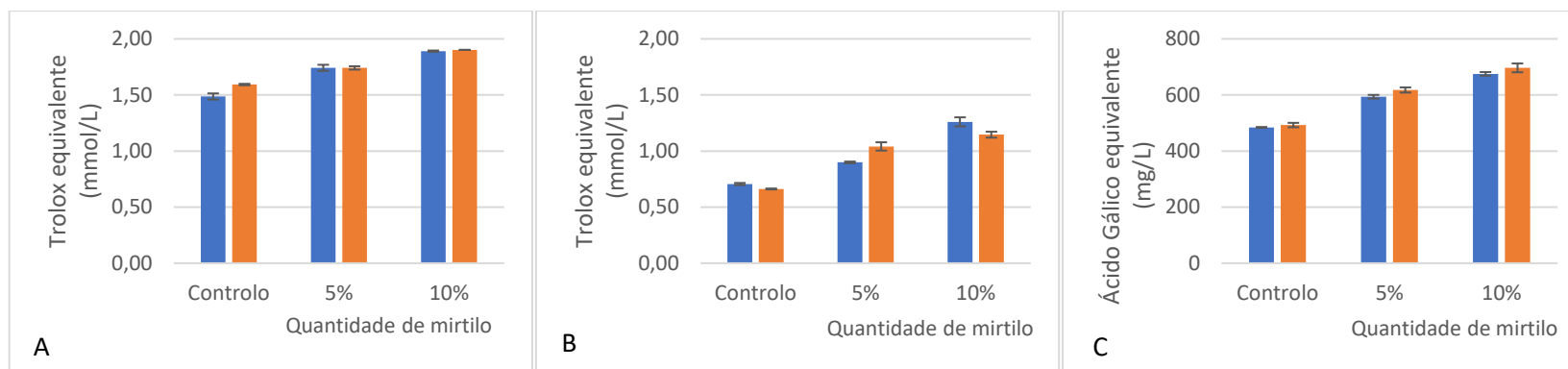


Figura 4-Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das cervejas do Experimento 1 em função do fator X₂ (quantidade de mirtilo adicionado no início da maturação) e do fator X₁, {temperatura dos três primeiros dias de maturação (5 °C (■) e 18 °C (■))}. O controlo refere-se a cerveja sem adição de mirtilo.

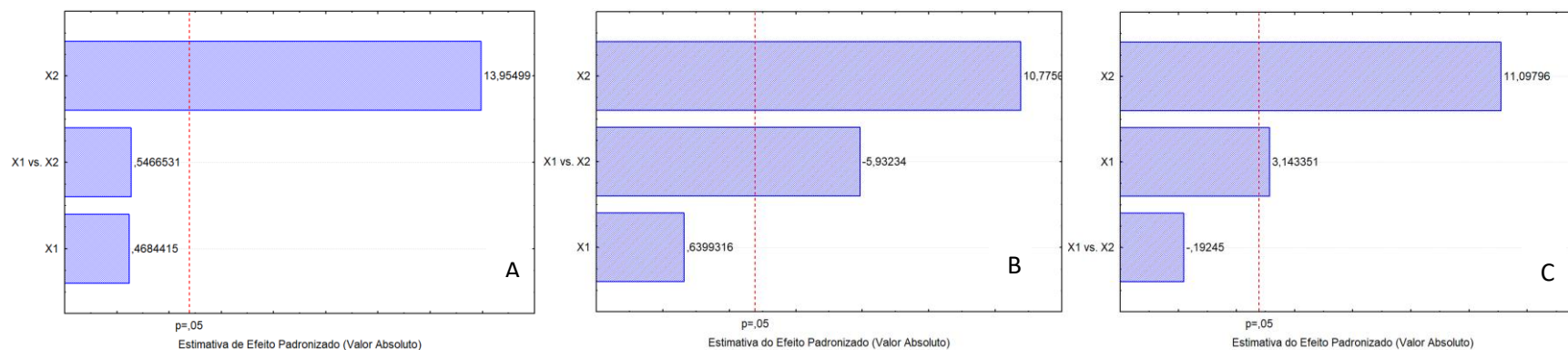


Figura 5-Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste *t* do Experimento 1, sendo X₁ a temperatura de maturação dos três primeiros dias (nível -1: 5 °C e nível +1: 18 °C), X₂ quantidade de mirtilo adicionado (nível -1: 5 % (m/v) e nível +1: 10 % (m/v)) no início da maturação e X₁ vs. X₂, a combinação dos dois fatores da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C).

Observando a tabela 10, não houve uma diferença significativa de densidade relativa e açúcares redutores entre as cervejas. A adição de 5 % (200 g) e 10 % (400 g) de sumo de mirtilo processado não influenciou estes parâmetros nos dois níveis do fator X₁ comparando com os respectivos controlos. A quantidade de sumo de mirtilo adicionado afetou o pH final da cerveja, sendo possível observar que as amostras com 10 % obtiveram uma maior diminuição quando comparadas com as amostras com 5%, tendo como referência as amostras controlo sem fruta. Quanto à concentração de antocianinas, observou-se que as amostras 5:400 e 18:400 obtiveram os valores mais elevados, 0,66 e 0,63 mg equivalente de cianidina-3-glicosídeo/L, respetivamente. Deste resultado é possível concluir que a diminuir a temperatura de 18 °C para 5 °C nos três primeiros dias de maturação, não afeta a concentração de antocianinas na cerveja. No entanto, esta diferença de temperatura afetou o conteúdo proteico das cervejas, este efeito é observado entre as amostras controlo e entre as amostras com a adição de 10 %. A amostra 18:400 apresentou maior conteúdo proteico, 0,83 % (m/m), sugerindo que a adição de maior quantidade de mirtilo e temperatura de 18 °C nos três primeiros dias de maturação, reduz a precipitação das proteínas. Por fim, a acidez titulável e o pH também é afetado pela quantidade de mirtilo adicionado. As amostras com maior adição de mirtilo obtiveram maior valor de acidez titulável e valor de pH mais baixos.

Tabela 10-Valores médios e respetivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 1. Sendo o X₁, a temperatura dos 3 primeiros dias de maturação, 5 °C (5) e 18 °C (18) e X₂ a massa adicionada de sumo mirtilo em gramas (200 e 400). As amostras 5C e 18C correspondem às amostras controlo do fator X₁, sem a adição de mirtilo.

Amostra (X ₁ :X ₂)	Média ± Desvio padrão						
	Proteína (% m/m)	Acidez titulável (g eq. ácido acético/100 mL)	pH	Sólidos totais (g/L)	Densidade relativa (20 °C)	Antocianinas (mg eq. cianidina-3-glicosídeo/L)	Açúcares redutores (g/L)
5C	0,46 ± 0,02 ^a	0,32 ± 0,01 ^a	4,42	5,78 ± 0,07 ^a	1,011 ± 0,000 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,06 ± 0,02 ^a
5:200	0,56 ± 0,00 ^{b,c}	0,37 ± 0,00 ^b	4,13	6,11 ± 0,05 ^{b,c}	1,012 ± 0,000 ^a	0,30 ± 0,01 ^b	1,06 ± 0,02 ^a
5:400	0,51 ± 0,01 ^{a,b}	0,40 ± 0,01 ^c	3,95	6,29 ± 0,01 ^b	1,011 ± 0,001 ^a	0,66 ± 0,01 ^c	1,07 ± 0,01 ^a
18C	0,60 ± 0,01 ^c	0,37 ± 0,00 ^b	4,42	5,59 ± 0,01 ^a	1,011 ± 0,000 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,06 ± 0,00 ^a
18:200	0,54 ± 0,00 ^{b,c}	0,37 ± 0,01 ^b	4,14	6,04 ± 0,02 ^c	1,011 ± 0,000 ^a	0,23 ± 0,01 ^d	1,04 ± 0,02 ^a
18:400	0,83 ± 0,01 ^d	0,42 ± 0,00 ^c	3,91	6,28 ± 0,03 ^b	1,012 ± 0,001 ^a	0,63 ± 0,01 ^c	1,06 ± 0,02 ^a

Nota: As médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5.2 Experimento 2

O Experimento 2 avaliou o pH (3,9 e 3,4) no início da maturação (X₁), a adição de 5% (m/m) de mirtilo na forma de sumo ou inteiro (X₂), assim como a interação desses dois fatores na atividade antioxidante em cerveja do estilo *Catharina Sour*. O processamento do mirtilo (ver 4.5 *Processamento do mirtilo*) resulta em 70% de sumo e 30% de cascas em massa do mirtilo congelado. Neste Experimento considerou-se o fator X₂ a percentagem de sumo adicionado de forma a tratar os níveis como uma variável contínua, ou seja, o nível inferior corresponde à adição de 70% de sumo e 30% de cascas e no nível superior 100% de sumo. Como se manteve constante a massa de mirtilo adicionado, foi necessário processar mais mirtilo para a adição no nível superior. Na figura 6 estão apresentados os resultados da atividade antioxidante, onde observa-se nas cervejas controlo que a acidificação com ácido láctico para pH 3,4 aumentou a capacidade antioxidante medida com o método DPPH (figura 6A).

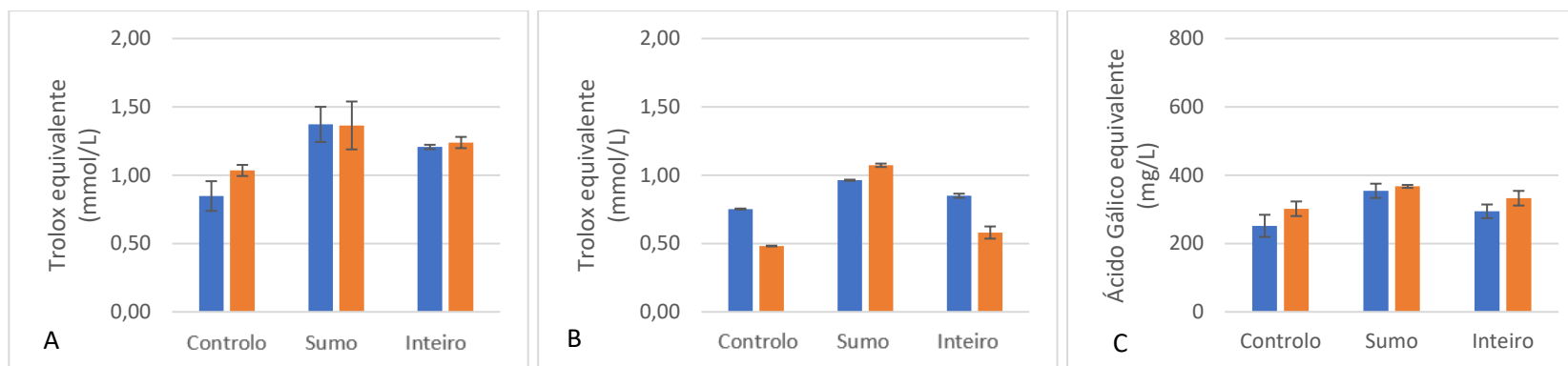


Figura 6- Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das cervejas do Experimento 2 em função do fator X_2 {inteiro= 70% sumo+30% casca (nível -1) ou sumo=100% sumo (nível +1)} e do fator X_1 {pH no início da maturação (pH 3,9 (■) e pH 3,4 (■))}.

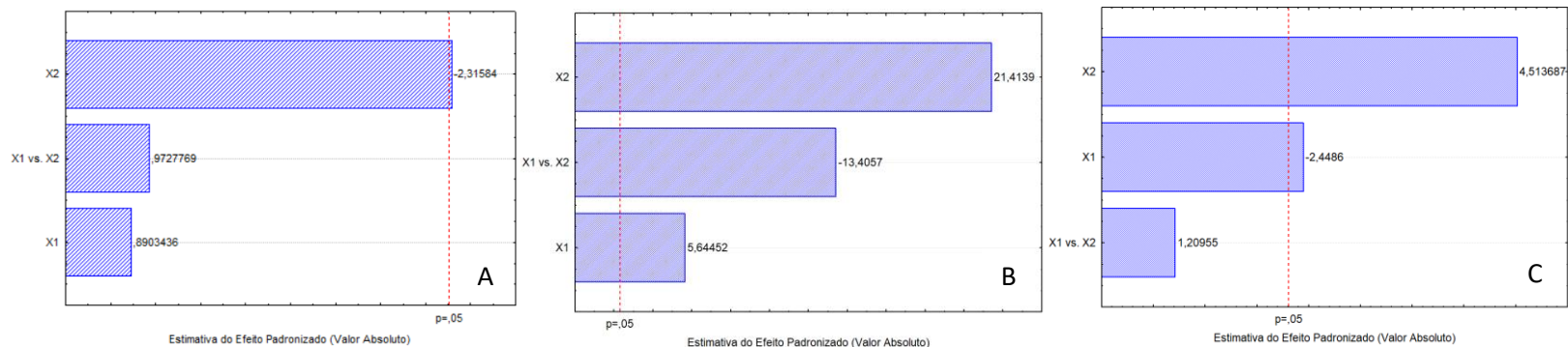


Figura 7-Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste t do Experimento 2, sendo X_1 pH no início da maturação (nível -1: 3,9 e nível +1: 3,4), X_2 a adição de 70% sumo+30% casca (inteiro) (nível -1) ou 100 % sumo (sumo) (nível +1) e X_1 vs. X_2 , a combinação dos dois fatores da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C).

Quanto aos compostos fenólicos, a percentagem de sumo na quantidade de mirtilo adicionado contribuiu para um efeito positivo (figura 6C) e os antioxidantes com capacidade de quelar iões metálicos (FRAP) diminuíram em cerca de 56% (figura 6B).

Na análise do diagrama de Pareto (figura 7), assim como no Experimento 1, os efeitos significativos dos fatores dependem do método analítico utilizado para medir a atividade antioxidante. Na atividade antioxidante medida pelo método FRAP (figura 7B) e na concentração de compostos fenólicos (figura 7C) observou-se um efeito positivo significativo com o aumento da percentagem de sumo, isto é, redução de casca no peso do mirtilo adicionado.

A quantidade de mirtilo adicionada no Experimento 2 foi de 5% (m/v). No nível inferior (-1), a massa possuía 70% de sumo e 30% de casca, enquanto que no nível superior (+1), a massa adicionada foi de 100% de sumo, o que leva a um maior consumo da matéria prima. Observando o diagrama de Pareto relativo à concentração dos compostos fenólicos (figura 7C) observa-se que a remoção das cascas tem significância estatística com efeito positivo. Reque *et al.* (2014) observaram que a pele do mirtilo possui 14 vezes mais compostos antioxidantes que a polpa, valores expressos em mg GAE/100g peso seco. A utilização do mirtilo inteiro (sumo e cascas) deveria permitir aumentar a concentração dos compostos fenólicos na cerveja, mas esses compostos presentes nas cascas não são extraídos para a fase líquida, precipitando junto com as cascas para a base e dessa forma não contribuem para o aumento do poder antioxidante do produto final. Moura *et al.* (2018) reportaram que a extração de compostos fenólicos de amostras de açaí foi mais eficiente usando à temperatura de 60 °C e com uma concentração de etanol de 800 g/L. Neste experimento, a concentração de etanol é de apenas 4,9%, valor muito inferior, não sendo favorecido a extração. Outra desvantagem em contexto industrial, a utilização das cascas pode trazer complicações e/ou alterações no processo, como por exemplo o entupimento de válvulas e a necessidade de instalar um pré-filtro na linha de enchimento de forma a evitar a colmatação antecipada do filtro.

Quanto ao pH (X_1), as cervejas mais ácido (pH 3,4) obtiveram resultados significativos medidos pelos métodos FRAP (figura 7B) e Folin-Ciocalteu (figura 7C), tendo um efeito positivo e um efeito negativo, respetivamente. O valor com maior relevância no poder antioxidante foi aquele medido pelo método FRAP (valor absoluto superior). Este resultado demonstra a dependência do método analítico utilizado, por causa da diversidade de mecanismos que os compostos com atividade antioxidante podem ter, é necessário diversificar os métodos de análise. De forma a otimizar o poder antioxidante é necessário ponderar qual dos mecanismos antioxidante possui maior contribuição para o poder antioxidante global do produto final e qual é o impacto do fator nesses mecanismos. Neste caso, é conhecido o valor do efeito entre os dois níveis do fator, mas não é possível saber qual dos mecanismos é mais importante para o resultado global, uma vez que as escalas utilizadas não são iguais, os resultados do método FRAP são obtidos em mmol/L de Trolox equivalente e a concentração dos compostos fenólicos em mg/L de ácido gálico.

Da tabela 11, observa-se que as cervejas apresentaram resultados de acidez titulável significativamente diferentes. Quanto ao teor de proteínas, observa-se que para o mesmo nível do fator X_1 (pH), as amostras com a adição do mirtilo inteiro possuem maior percentagem mássica proteica

(0,47% e 0,59% para pH 3,9 e pH 3,4, respetivamente) que as amostras com a adição do sumo (0,40% e 0,50% para pH 3,9 e pH 3,4, respetivamente). Não se observou diferenças na concentração de sólidos totais nas amostras das cervejas maturadas a pH 3,9, enquanto que a pH 3,4, para a amostra com a adição do mirtilo inteiro (3,4:I) obteve-se o valor mais elevado ($7,23 \pm 0,02$ g/L).

Tabela 11-Valores médios e respetivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 2. Sendo o X_1 , o valor de pH (3,9 e 3,4) no início da fase de maturação e X_2 , a utilização do mirtilo inteiro (I) ou do sumo (S). As amostras 3,9C e 3,4C correspondem às amostras controlo do fator X_1 , sem a adição de mirtilo.

Amostra ($X_1:X_2$)	Média \pm Desvio padrão						
	Proteína (% m/m)	Acidez titulável (g eq. Ácido acético/100 mL)	pH	Sólidos totais (g/L)	Densidade relativa (20 °C)	Antocianinas (mg eq. cianidina-3-glicosídeo/L)	Açúcares redutores (g/L)
3,9C	$0,48 \pm 0,01^a$	$0,57 \pm 0,01^a$	3,84	$4,93 \pm 0,03^a$	$1,013 \pm 0,000^a$	$0,00 \pm 0,00^a$	$1,78 \pm 0,12^a$
3,9:I	$0,47 \pm 0,01^a$	$0,69 \pm 0,00^b$	3,79	$5,30 \pm 0,10^a$	$1,014 \pm 0,001^a$	$0,29 \pm 0,01^b$	$1,75 \pm 0,07^a$
3,9:S	$0,40 \pm 0,01^b$	$0,73 \pm 0,01^c$	3,76	$5,08 \pm 0,08^a$	$1,014 \pm 0,000^a$	$0,59 \pm 0,01^c$	$1,78 \pm 0,12^a$
3,4C	$0,47 \pm 0,01^a$	$1,15 \pm 0,01^d$	3,37	$5,97 \pm 0,03^b$	$1,017 \pm 0,001^{a,b}$	$0,00 \pm 0,00^a$	$1,80 \pm 0,10^a$
3,4:I	$0,59 \pm 0,01^c$	$1,93 \pm 0,01^e$	3,30	$7,23 \pm 0,02^c$	$1,021 \pm 0,001^c$	$0,33 \pm 0,01^b$	$1,95 \pm 0,05^a$
3,4:S	$0,50 \pm 0,00^a$	$1,56 \pm 0,00^f$	3,26	$6,65 \pm 0,15^d$	$1,021 \pm 0,001^{b,c}$	$0,68 \pm 0,01^d$	$2,13 \pm 0,02^a$

Nota: As médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

O pH não afetou a concentração de antocianinas nas amostras com a adição do mirtilo inteiro (I), enquanto que nas amostras com adição de sumo, a amostra 3,4:S possui maior concentração, $0,68 \pm 0,01$ mg eq. cianidina-3-glicosídeo/L comparando a amostra 3,9:S. Neste caso, observa-se uma maior estabilidade desse composto a pH mais ácido, assim como descrito por Kalt *et al.* (2000). Nas amostras com a adição do mirtilo inteiro, a variação do 0,5 valores de pH não foi suficiente pra se observar uma diferença significativa. É de notar ainda que nas amostras de pH 3,4, os valores de densidade relativa foram mais elevados comparativamente com as amostras de pH 3,9. Assim como no Experimento 1, não se observa uma diferença significativa da quantidade de açúcares redutores no produto final.

5.3 Experimento 3

No Experimento 3 o fator X_1 estudado foi o álcool. Após a fermentação primária, a cerveja do nível -1 não sofreu alteração, enquanto que na do nível +1 foi adicionado álcool de cereais. A estimativa do álcool das cervejas do nível +1 (7,7% v/v) foi calculado com base na estimativa do álcool da cerveja controlo do nível -1 (5,5% v/v, tabela 8), correspondente a um aumento de 40%.

À semelhança dos experimentos anteriores, analisou-se o poder antioxidante pelo método DPPH e FRAP e a concentração dos compostos fenólicos pelo método Folin-Ciocalteu pelo nas cervejas produzidas resultantes do planeamento fatorial 2^2 (figura 8).

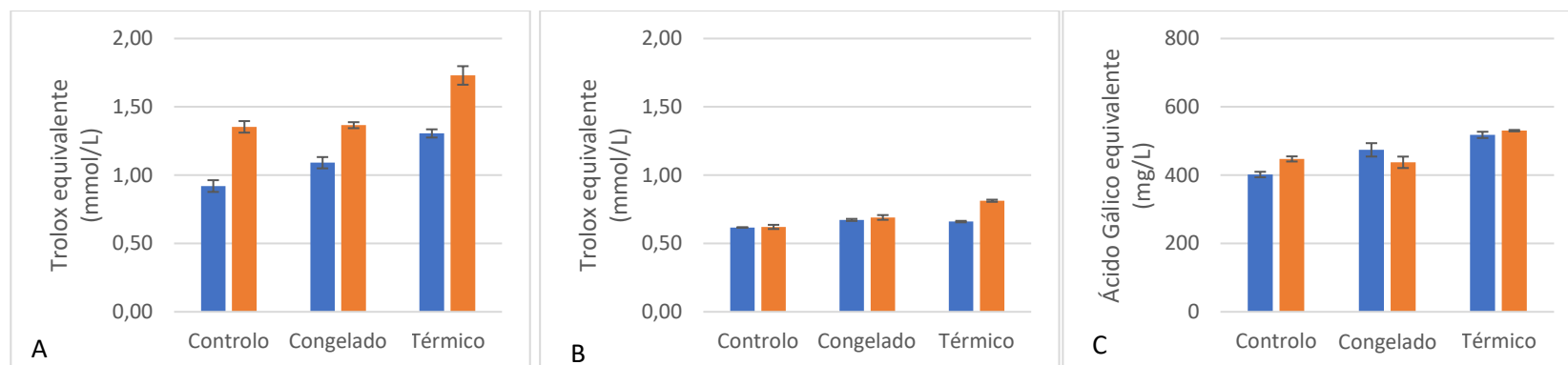


Figura 8- Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das cervejas do Experimento 3 em função do fator X_2 (controlo e utilização do mirtilo congelado (nível -1) ou com tratamento térmico (nível +1)) e do fator X_1 , álcool (nível -1: 5,5 (% v/v) (■) e nível +1: 7,7 (% v/v) (■)).

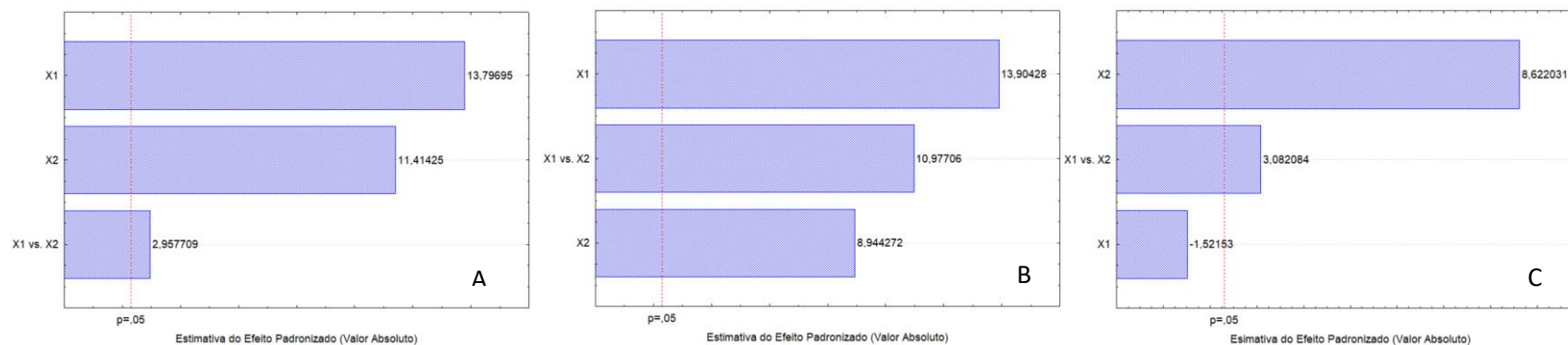


Figura 9- Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste t do Experimento 3, sendo X_1 o teor alcoólico em % v/v (nível -1: 5,5 e nível +1: 7,7), X_2 utilização do mirtilo congelado (nível -1) ou com tratamento térmico (nível +1) e X_1 vs. X_2 , a combinação dos dois fatores, da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C).

Assim como observado no Experimento 1, no Experimento 3 a capacidade antioxidante de quelar iões metálicos (figura 8B) é cerca de metade da capacidade antioxidante de capturar radicais livres (figura 8A). O aumento do teor alcoólico para 7,7% (v/v), o tratamento térmico ao mirtilo e a combinação desses dois fatores foram relevantes para o aumento do poder antioxidante e dos compostos fenólicos, à exceção do impacto do teor alcoólico nos compostos fenólicos (figura 9C). A amostra com 7,7% (v/v), com adição de mirtilo e com tratamento térmico apresentou 1,73 mmol Trolox/L, 0,813 mmol Trolox/L e 530,4 mg GAE/L, nos métodos DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu, respetivamente, tendo sido a cerveja com os resultados mais elevados deste experimento. Assim, é possível prever que a utilização de mirtilo com tratamento térmico em cervejas com maior teor alcoólico aumenta a atividade antioxidante.

Da tabela 12 é possível observar que os valores de sólidos totais e densidade relativa das amostras do Experimento 3 não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Kalt *et al.* (2000) reportaram que submetendo o mirtilo a 60 °C por 60 min, a concentração de antocianinas aumentou 15 vezes e 2 vezes a concentração de compostos fenólicos quando comparado com a extração a 25 °C, sugerindo que o aumento da temperatura favorece a extração. O mesmo foi observado nas amostras do Experimento 3 (tabela 11), onde duas amostras com maior concentração de antocianinas foram aquelas com a adição de mirtilo com tratamento térmico, 0,84 e 0,74 mg equivalente de cianidina-3-glicosídeo/L, respetivamente para as amostras com teor alcoólico de 5,5 e 7,7% (v/v). É possível concluir que o tratamento térmico do mirtilo é essencial para aumentar o poder antioxidante das cervejas.

Tabela 12-Valores médios e respetivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 3. Sendo o X₁, o teor alcoólico (5,5 e 7,7 % v/v) no início da fase de maturação e X₂, a utilização do mirtilo congelado (F) ou com tratamento térmico (T). As amostras 5,5C e 7,7C correspondem às amostras controlo do fator X₁, sem a adição de mirtilo.

Amostra (X ₁ :X ₂)	Média ± Desvio padrão						
	Proteína (% m/m)	Acidez titulável (g eq. Ácido acético/100 mL)	pH	Sólidos totais (g/L)	Densidade relativa (20 °C)	Antocianinas (mg eq. cianidina-3-glicosídeo/L)	Açúcares redutores (g/L)
5,5C	0,43 ± 0,01 ^a	0,31 ± 0,01 ^a	4,25	5,55 ± 0,05 ^a	1,014 ± 0,000 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,90 ± 0,06 ^{a,c}
5,5:F	0,48 ± 0,01 ^{b,c}	0,32 ± 0,00 ^a	4,04	5,63 ± 0,02 ^a	1,015 ± 0,000 ^a	0,26 ± 0,01 ^b	1,29 ± 0,12 ^b
5,5:T	0,52 ± 0,01 ^c	0,39 ± 0,00 ^b	4,03	5,60 ± 0,05 ^a	1,015 ± 0,000 ^a	0,84 ± 0,00 ^c	2,06 ± 0,01 ^{a,c}
7,7C	0,39 ± 0,01 ^d	0,21 ± 0,00 ^c	4,35	5,60 ± 0,04 ^a	1,013 ± 0,001 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	2,17 ± 0,01 ^c
7,7:F	0,46 ± 0,00 ^{a,b}	0,32 ± 0,00 ^a	4,06	5,67 ± 0,02 ^a	1,015 ± 0,000 ^a	0,39 ± 0,01 ^d	1,70 ± 0,10 ^{a,c}
7,7:T	0,49 ± 0,01 ^{b,c}	0,37 ± 0,00 ^d	4,06	5,67 ± 0,05 ^a	1,015 ± 0,001 ^a	0,74 ± 0,01 ^e	2,04 ± 0,03 ^{a,c}

Nota: As médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

5.4 Experimento 4

Neste experimento pretendeu-se estudar o efeito da gelatina (X_1) na diminuição do conteúdo proteico da cerveja, além do momento da adição do mirtilo (no início da maturação ou passado 14 dias, antes do engarrafamento) (X_2), avaliando o impacto na interação entre compostos fenólicos e proteínas na atividade antioxidante do produto final.

Analisando a figura 10B, a adição de 0,3 g/L de gelatina apenas teve significância com efeito positivo sobre a atividade antioxidante medida pelo método FRAP. Em relação ao momento da adição do mirtilo (X_2), esse fator teve uma relevância significativa constatada pelos três métodos de análise, indicando que adicionar o mirtilo no final da maturação permite obter um produto final com maior atividade antioxidante comparando com a adição no início da maturação. Ao adicionar o mirtilo apenas no final da maturação, as proteínas não possuem tempo suficiente para complexar com os polifenóis e precipitaram e serem removidas antes do engarrafamento. É interessante observar que a combinação dos dois fatores (X_1 vs. X_2) possui um impacto positivo na atividade antioxidante medida pelo método DPPH (figura 11A) e na concentração dos compostos fenólicos (figura 11C), mas um efeito negativo pela capacidade de quelar iões metálicos (figura 11B). Assim como no Experimento 2, o fato dos resultados serem expressos em unidades diferentes dificulta a escolha de qual seria o fator com maior contribuição.

Por fim, é possível observar que as cervejas do Experimento 4, do estilo *Oatmeal Stout*, obtiveram 2 a 3 vezes, aproximadamente, concentração mais elevada de compostos fenólicos (média de 970 mg GAE/L) em relação às outras cervejas produzidas neste trabalho. Este fato deve-se principalmente à utilização de malte escuro por possuírem mais produtos da reação de Maillard, como reportado por Vinson *et al* (2003).

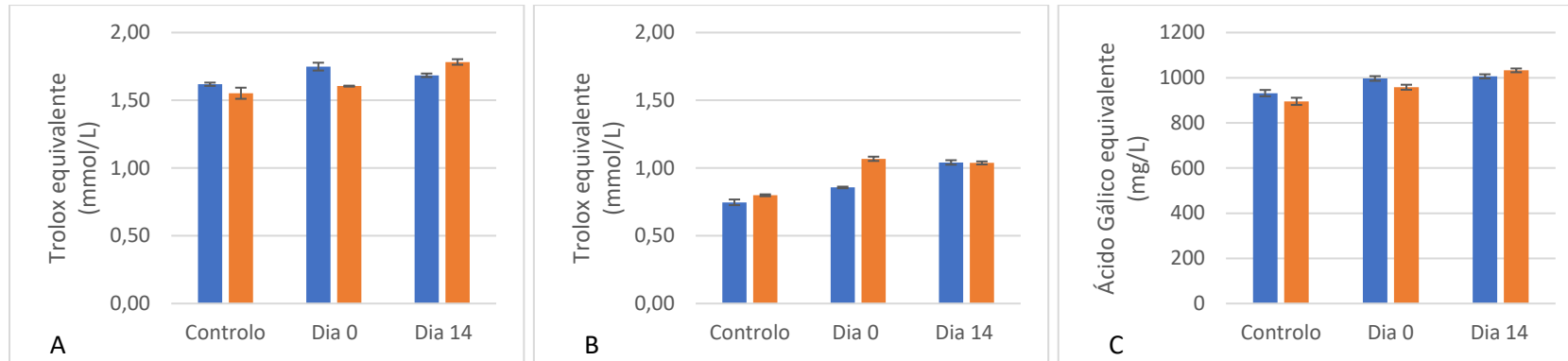


Figura 10- Atividade antioxidante medida em concentração equivalente de Trolox (mmol/L) obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos em equivalentes de ácido gálico (mg/L) obtida a partir do método Folin-Ciocalteu (C) das amostras do Experimento 4 em função do fator X_2 (adição do mirtilo no dia 0 (nível -1) no dia 14 (nível +1) da maturação) e do fator X_1 , a utilização de gelatina (nível -1: com adição de 0,3 g/L (■) e nível +1: sem adição (■)).

36

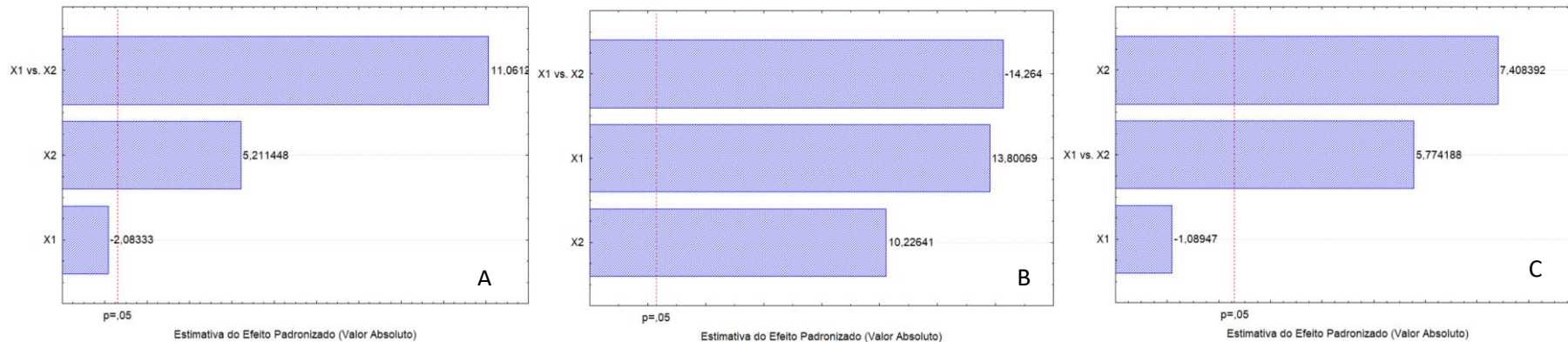


Figura 11-Gráfico de Pareto em função dos valores da estatística do teste t do Experimento 4, sendo X_1 a utilização de gelatina (nível -1: com adição de 0,3 g/L e nível +1: sem adição), X_2 a adição do mirtilo no dia 0 (nível -1) no dia 14 (nível +1) da maturação e X_1 vs. X_2 , a combinação dos dois fatores, da atividade antioxidante obtida através do método DPPH (A) e FRAP (B) e concentração de compostos fenólicos obtidos a partir do método Folin-Ciocalteu (C).

Comparando as amostras com o mesmo nível do fator X_2 , na amostra controle houve uma diminuição de 13% do conteúdo proteico e de 14 e 7% nas amostras com adição de mirtilo no momento no início da maturação (dia 0) e no engarrafamento, respectivamente, demonstrando que a adição da gelatina contribuiu para precipitar as proteínas que possam estar ou não complexadas com os polifenóis. (Tabela 13). Quanto à concentração de açúcares redutores, os valores obtidos foram superiores nas amostras com a adição do mirtilo no momento do envase. No momento do envase a concentração de leveduras é menor sendo o consumo dos açúcares da fruta mais lenta. Comparando com a adição no início da maturação, o tempo de contato das leveduras com esse substrato foi menor em 14 dias, o que pode explicar esse resultado.

Tabela 13- Valores médios e respectivo desvio padrão das amostras das cervejas do Experimento 4. Sendo o X_1 , a utilização de gelatina (sem adição (S) e com adição de 0,3 g/L (G) e X_2 , o momento da adição do mirtilo (no início da maturação ou no momento do envase (E)). As amostras SC e GC correspondem às amostras controle do fator X_1 , sem a adição de mirtilo.

Amostra ($X_1:X_2$)	Média ± Desvio padrão						
	Proteína (% m/m)	Acidez titulável (g eq. Ácido acético/100 mL)	pH	Sólidos totais (g/L)	Densidade relativa (20 °C)	Antocianinas (mg eq. cianidina-3-glicosídeo/L)	Açúcares redutores (g/L)
SC	0,53 ± 0,01 ^{a,d}	0,29 ± 0,01 ^a	4,49	5,70 ± 0,05 ^a	1,020 ± 0,000 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,25 ± 0,02 ^a
S:M	0,57 ± 0,02 ^{a,b}	0,33 ± 0,00 ^b	4,17	6,70 ± 0,05 ^b	1,021 ± 0,000 ^a	0,69 ± 0,01 ^b	1,31 ± 0,02 ^{a,c}
S:E	0,59 ± 0,01 ^b	0,32 ± 0,00 ^b	4,15	7,25 ± 0,04 ^c	1,021 ± 0,000 ^a	1,12 ± 0,01 ^c	2,35 ± 0,05 ^b
GC	0,46 ± 0,01 ^c	0,27 ± 0,01 ^a	4,48	5,26 ± 0,04 ^d	1,018 ± 0,001 ^a	0,00 ± 0,00 ^a	1,28 ± 0,03 ^{a,c}
G:M	0,49 ± 0,00 ^{c,d}	0,34 ± 0,01 ^b	4,18	6,47 ± 0,09 ^b	1,020 ± 0,000 ^a	0,80 ± 0,05 ^b	1,47 ± 0,06 ^c
G:E	0,55 ± 0,01 ^{a,b}	0,37 ± 0,01 ^c	4,13	7,13 ± 0,03 ^c	1,020 ± 0,001 ^a	1,17 ± 0,01 ^c	2,40 ± 0,02 ^b

Nota: As médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5 % de probabilidade.

5.5 Colorimetria

Na tabela 14 encontram-se apresentados os valores obtidos por colorimetria no sistema CIELAB das amostras de cerveja de todos os experimentos. É possível observar que amostras com adição de mirtilo obtiveram valores superior de a^* (mais vermelho) em relação às amostras controle respectivas, com exceção das amostras da cerveja *Oatmeal Sout*. Nas cervejas escuras a adição de mirtilo possui pouco impacto na cor, não sendo um método recomendável para ser usado como método de controle de qualidade do produto. O mesmo se observa nos valores de distância de cor entre as amostras com mirtilo e o respectivo controle. As amostras da cerveja escura obtiveram valores, de distância de cor para o controle, inferior a 2 enquanto que as restantes amostras obtiveram valores de distância entre 14 e 33. A qualidade sensorial do alimento e a manutenção da mesma favorece a fidelidade do consumidor a um produto, sendo um parâmetro a ter em conta na análise de qualidade por parte do produtor.

Tabela 14- Valores médios das coordenadas de cor das amostras (L*-luminosidade; a*-vermelho vs. verde; b*-amarelo vs. azul), tonalidade (h*), saturação (C*) e a distância entre as amostras e o respetivo controlo (ΔE^*).

Experimento	Amostra	L*	a*	b*	h*	C*	ΔE^*
1	5C	48,75	1,84	24,95	1,50	25,02	-
	18C	48,30	2,01	24,43	1,49	24,52	-
	5:200	28,59	12,05	9,67	0,68	15,45	27,28
	5:400	25,85	13,29	5,39	0,39	14,34	32,23
	18:200	30,52	13,50	12,17	0,73	18,18	24,46
	18:400	25,54	14,11	5,91	0,40	15,30	31,74
2	3,9C	50,51	1,13	20,32	1,52	20,35	-
	3,4C	48,94	1,76	19,99	1,48	20,07	-
	3,9:S	30,44	21,27	12,91	0,55	24,88	29,38
	3,9:I	35,93	17,01	15,48	0,74	23,00	22,10
	3,4:S	26,53	19,64	9,39	0,45	21,77	30,56
	3,4:I	31,86	24,45	15,46	0,56	28,93	28,76
3	5,5C	52,50	-0,46	20,99	-1,55	21,00	-
	7,7C	48,80	1,43	18,48	1,49	18,53	-
	5,5:T	36,29	20,58	14,24	0,61	25,03	27,41
	5,5:F	43,60	11,22	16,58	0,98	20,02	15,34
	7,7:F	33,31	20,07	12,96	0,57	23,89	24,85
	7,7:T	42,12	13,85	16,42	0,87	21,48	14,25
4	SC	21,68	2,21	1,84	0,69	2,88	-
	GC	21,89	3,08	1,77	0,52	3,55	-
	S:M	22,03	2,05	1,41	0,60	2,49	0,578
	G:M	22,81	1,92	1,45	0,65	2,40	1,520
	S:E	22,70	2,35	1,24	0,49	2,66	1,187
	G:E	23,03	2,72	1,44	0,49	3,08	1,246

Nota: Código das amostras conforme descrito anteriormente nas legendas das tabelas 9, 10, 11 e 12, disponíveis nas páginas 29, 32, 34 e 37, respetivamente.

5.6 Envelhecimento natural

O estudo do envelhecimento natural foi realizado nas cervejas do Experimento 1 e teve por objetivo avaliar a atividade antioxidante das cervejas ao fim de 2 meses de armazenamento em duas condições diferentes, a 5 °C e à temperatura ambiente (18-25 °C). Os resultados estão apresentados na figura 12. Em termos da concentração de antioxidantes com capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH), em ambas as condições de envelhecimento as amostras 5C e 18C obtiveram maiores valores de decaimento, 17% para a amostra 5C e 18% e 25% para a amostra 18C, para o envelhecimento à temperatura ambiente e a temperatura de 5 °C, respetivamente. Enquanto que as amostras com adição de mirtilo, o decaimento do poder antioxidante variou entre 1 e 4% para nas amostras mantidas a temperatura ambiente e entre 3 e 9 % as amostras mantidas a 5 °C (figura 12).

A amostra 18C mantida a 5 °C não apresentou perda da capacidade de quelar iões metálicos ao fim dos 2 meses de armazenamento a 5 °C (figura 12B). De modo geral, a concentração de compostos fenólicos teve um maior decaimento nas amostras mantidas a 5 °C comparando com as

cervejas mantidas a temperatura ambiente. O que explica essa constatação, é que em temperaturas mais baixas promove-se a precipitação do complexo proteína-polifenol.

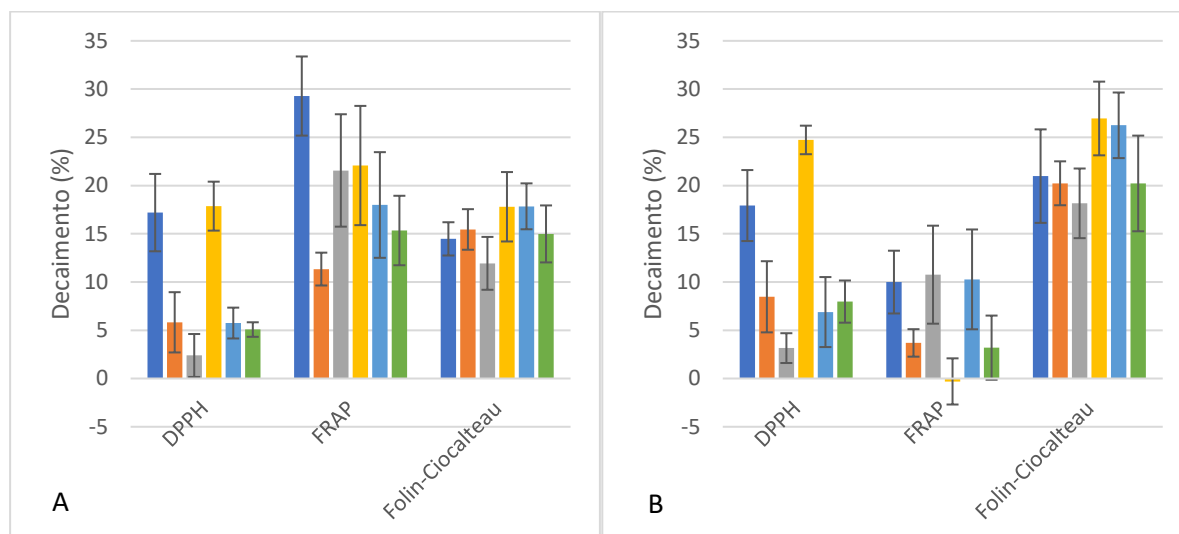


Figura 12- Decaimento (%) da atividade antioxidante (analisado pelo método DPPH e FRAP) e da concentração de compostos fenólicos (analisada pelo método Folin-Ciocalteu) após 60 dias de envelhecimento natural a temperatura ambiente (18-25 °C) (A) e a temperatura de 5 °C (B) das cervejas do Experimento 2. Legenda: ■-5C; ■-5:200; ■-5:400; ■-18C; ■-18:200; ■-18:400.

5.7 Envelhecimento forçado

As cervejas produzidas no Experimento 3 foram submetidas a um envelhecimento forçado de forma a prever de forma simples e rápida o decaimento da atividade antioxidante que ocorreria após 7 meses de armazenamento. Os resultados estão apresentados na figura 13.

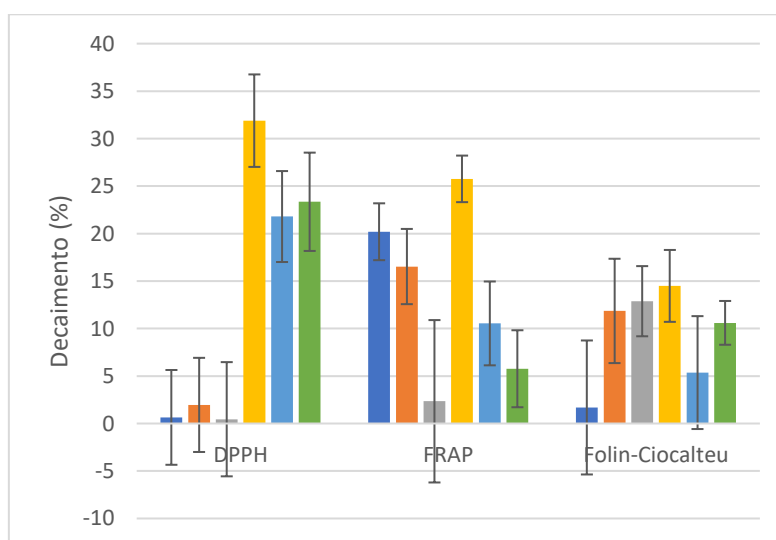


Figura 13-Decaimento (%) da atividade antioxidante pelo método DPPH e FRAP e da concentração de compostos fenólicos obtidos pelo método Folin-Ciocalteu do envelhecimento forçado durante 7 dias a 50 °C (equivalente a 7 meses de envelhecimento natural a 25 °C) das amostras do Experimento 3. Legenda: ■-5,5C; ■-5,5C; ■-5,5:T; ■-7,7C; ■-7,7:F; ■-7,7:T.

No figura 13 pode-se observar que as cervejas com teor alcoólico de 5,5 % (v/v) não mostraram alterações no poder antioxidante medido método DPPH, enquanto que as amostras a 7,7 % (v/v) foram a que sofreram maior decaimento, com 32%, 22% e 23% nas amostras 7,7C, 7,7:F e 7,7:T, respetivamente. A cerveja que apresentou maior decaimento medido nos três métodos analíticos foi a amostra 7,7C que corresponde à amostra controlo com 7,7% de álcool (v/v), sendo 32%, 26% e 15% pelos métodos DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu, respetivamente. Ou seja, para amostras sem adição de fruta, o aumento do teor alcoólico promove maior decaimento da atividade antioxidante, além da diminuição da concentração de compostos fenólicos. Este resultado sugere que para uma melhor preservação da atividade antioxidante durante o armazenamento, as cervejas com adição de mirtilo devem ter teores alcoólicos mais elevados.

5.8 Análise das componentes principais

Das interações realizadas pelo *software Statistica* dos valores médios de 24 amostras e das variáveis DPPH, FRAP, compostos fenólicos, proteínas, acidez titulável, pH, densidade relativa, sólidos totais, antocianinas, açúcares redutores, álcool e três coordenadas de colorimetria (L^* , a^* e b^*) do produto final, foram devolvidas 14 PCs, entre os quais os 4 primeiros possuem *Eigenvalues* superiores a 1 com uma variância acumulada de 82,73 %. Essa são os PCs relevantes a ter em consideração no tratamento de dados.

Tabela 15-*Eigenvalue* da matriz das correlações e estatísticas relacionadas.

PC	<i>Eigenvalue</i>	Variância total %	Acumulado %
1	5,2150	37,25	37,25
2	3,4004	24,29	61,54
3	1,7471	12,48	74,02
4	1,2191	8,71	82,73
5	0,9097	6,50	89,22
6	0,5978	4,27	93,49
7	0,3931	2,81	96,30
8	0,1957	1,40	97,70
9	0,1418	1,01	98,71
10	0,0958	0,68	99,40
11	0,0634	0,45	99,85
12	0,0101	0,07	99,92
13	0,0075	0,05	99,98
14	0,0034	0,02	100,00

A primeira componente principal (PC1) representa 37,25% da variabilidade do conjunto de dados, e a segunda componente principal representa 24,29%. A soma destas duas componentes é de 61,54 %, representando mais da metade da variação do conjunto de dados. Na figura 14 apresenta-se a representação do espaço criado pelas duas componentes principais de maior relevo (PC1 e PC2). Quanto menor for o ângulo formado entre as linhas azuis das variáveis maior é a sua correlação. A

proximidade ao círculo vermelho indica o seu peso para o sistema de coordenadas. Estes valores podem ser consultados no anexo A5.

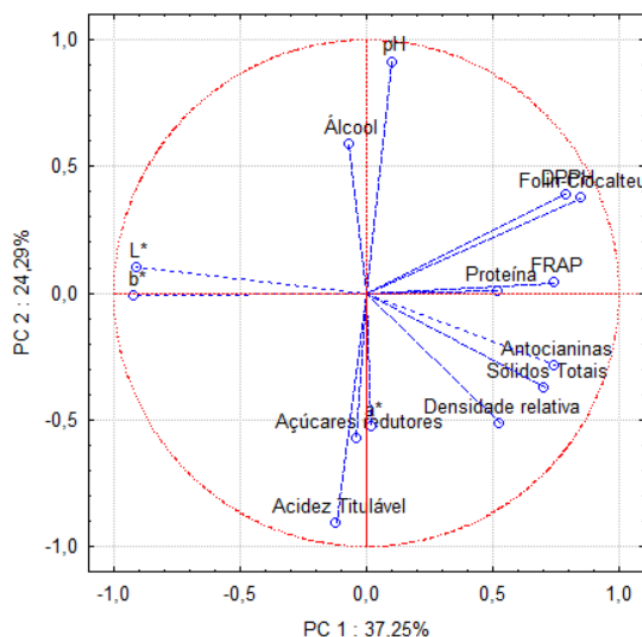
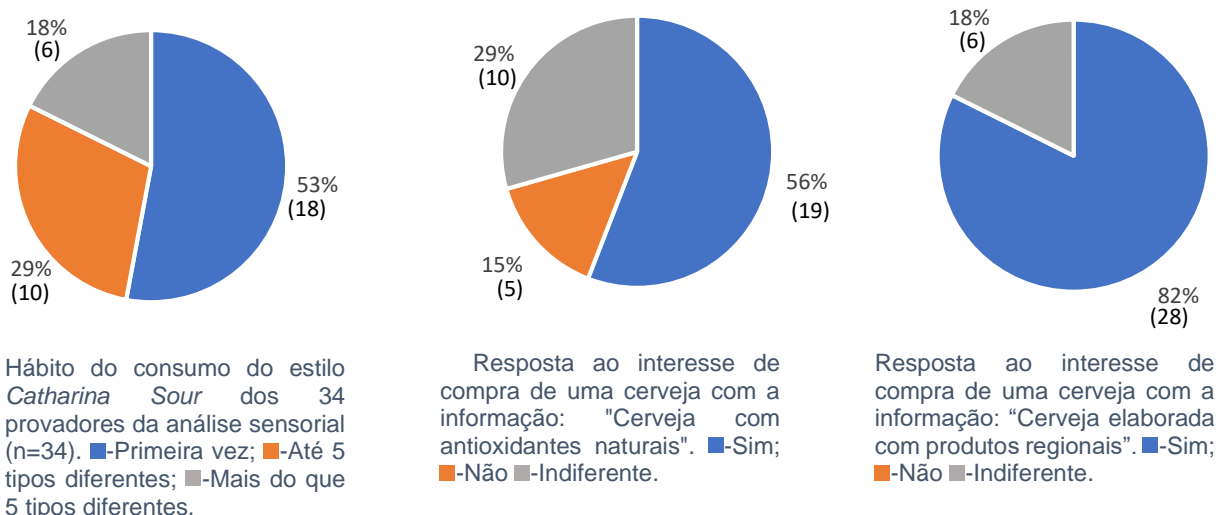


Figura 14- Análise das componentes principais PC1 vs. PC2.

Analisando o resultado do PCA (figura 14) é possível observar que os dois métodos analíticos utilizados para determinar o poder antioxidante encontram-se no primeiro quadrante, mostrando que possuem uma correlação positiva entre eles. O método Folin-Ciocalteu também se encontra nesse mesmo quadrante, mais próximo do método DPPH do que do método FRAP, sugerindo que os compostos fenólicos presentes nas amostras das cervejas possuem como mecanismo antioxidante a capacidade de sequestrar radicais livres. A concentração de sólidos totais do produto final corresponde aos açúcares que não foram fermentados, proteínas e outros compostos, entre os quais as antocianinas, que contribuem para a densidade relativa da cerveja final. Praticamente todos estes parâmetros encontram-se no quarto quadrante, sugerindo que existe de fato uma relação positiva entre estes atributos. Em relação à cor, as coordenadas L^* e b^* encontram-se no segundo quadrante, enquanto que a coordenada a^* (valores positivos correspondem à cor vermelha) se aproximou da variável antocianinas, sugerindo que amostras mais vermelhas possuem maior concentração de antocianinas. O pH encontra-se correlacionado negativamente com a acidez titulável, isto é, quanto mais baixo for o pH, maior é o valor de acidez titulável. Este resultado foi observado em todos os Experimentos realizados neste trabalho. Com estes dois PC, não se observa uma relação negativa entre o conteúdo proteico e a concentração de polifenóis. De facto, nos resultados do Experimento 4, a adição de gelatina reduziu a concentração de proteínas, mas não teve impacto significativo na concentração dos compostos fenólicos (ver 5.4 Experimento 4).

5.9 Análise sensorial

Cerca de metade dos produtores provaram pela primeira vez uma cerveja do estilo de *Catharina Sour* nessa análise sensorial. Embora esse estilo tenha sido criado no Estado de Santa Catarina, ainda continua a ser desconhecido junto dos consumidores. Dos inquiridos, 56% responderam que se interessam por cerveja com antioxidantes naturais e a maioria (82%) responderam demonstraram interesse de compra de cerveja elaborada com produtos regionais (figuras 15-17).



Nos parâmetros Aparência, Aroma e Corpo, segundo os consumidores, as cervejas não apresentaram diferença significativa entre si. Quanto ao parâmetro Sabor, as amostras com pH diferente diferiram entre si. As amostras 473 e 671, obtiveram uma classificação global, na escala hedônica, mais elevada no grupo 1 e 2, respetivamente (tabela 16). Essas amostras correspondem às cervejas com pH de 3,9, indica que os consumidores preferem cerveja menos ácida.

Tabela 16-Avaliação sensorial segundo a escala hedônica de 9 classificações entre 1 (Desgostei muitíssimo) e 9 (Gostei muitíssimo) (n=34).

Grupo	Código	X ₁ (pH)	X ₂ (casca vs. sumo)	Aparência	Aroma	Sabor	Corpo	Global
1	473	3,9	100% sumo	7,76 ^a	7,71 ^a	7,53 ^b	7,18 ^a	7,55
	252	3,4	70% sumo+30% casca	7,76 ^a	6,68 ^a	5,12 ^a	6,29 ^a	6,46
2	134	3,4	100% sumo	6,94 ^a	6,59 ^a	5,59 ^a	6,47 ^a	6,40
	671	3,9	70% sumo+30% casca	7,35 ^a	7,58 ^a	7,65 ^b	7,29 ^a	7,47

Nota: As médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade (p<0,05).

Relativamente à classificação da acidez e percepção da fruta de acordo com a escala JAR (tabela 17) os resultados mostram que ambos os grupos de produtores consideraram as cervejas com pH 3,4 como demasiado ácidas face à sua preferência pessoal (amostras 252 e 134). As cervejas com pH 3,9 (473 e 671), obtiveram resultados de 2,94 e 2,82 respetivamente, muito próximos do valor considerado ideal (valor 3 da escala JAR).

Tabela 17-Resultados da avaliação dos parâmetros Acidez e Percepção da fruta na escala JAR com 5 classificações (1-Pouco a 5-Muito)

Grupo	Amostra	Acidez	Percepção da fruta
1	473	2,94 ^a	2,53 ^a
	252	4,71 ^b	2,71 ^a
2	134	4,35 ^b	2,94 ^a
	671	2,82 ^a	2,76 ^a

Nota: As médias seguidas de letras distintas na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

Em relação à percepção da fruta, os provadores não distinguiram diferenças (tabela 17). O pH e a adição do mirtilo com cascas ou apenas o sumo não impactaram o produto final nessa característica do ponto de vista do consumidor.

O número de provadores nesta análise foi inferior ao recomendável para uma análise de preferência (recomenda-se no mínimo 50 provadores) e para a aceitação do produto (recomendado um mínimo de 112 provadores) (Dutcosky, 2011). A análise sensorial é frequentemente utilizada para medir características sensoriais e aceitabilidade do produto na indústria alimentar. Permite identificar a presença ou a ausência de diferenças perceptíveis, definir características sensoriais importantes de um produto e avaliar a aceitação do produto entre os consumidores, que não podem ser detetados por procedimentos analíticos. As diferenças perceptíveis podem ser determinadas pelos testes afetivos, que tem por objetivo conhecer a avaliação dos consumidores sobre um ou mais produtos. A escala hedônica faz parte dos testes afetivos sendo uma escala usualmente utilizada nos testes de aceitação do produto. Enquanto que a escala *Just-About-Right* (JAR) permite avaliar a intensidade dos atributos que é desejada pelos consumidores e ajudar no melhoramento do produto. A desvantagem do uso da escala JAR está relacionada à interpretação por parte dos provadores. O provador pode considerar que o atributo avaliado é muito forte, mas ser o nível que ele prefere. O mesmo pode acontecer com o nível muito fraco.

6 Conclusões

O objetivo deste trabalho foi analisar o poder antioxidante em cervejas com mirtilo adicionado. Diferentes cervejas foram produzidas, seguindo diferentes variedades dentro das documentadas no guia do BJCP, e diferentes fatores foram estudados em cada cerveja para perceber quais poderiam ter impacto no poder antioxidante do produto final. Deste modo, foram realizados quatro experimentos diferentes (cada experimento representando um estilo de cerveja diferente: *Pilsen* (Experimento 1), *Catherina Sour* (Experimento 2), *American Strong Ale* (Experimento 3) e *Oatmeal Stout* (Experimento 4) sendo que para cada um, uma análise fatorial foi realizada com dois fatores a dois níveis. As cervejas produzidas para o estudo fatorial cumpriram parcialmente as especificações das diretrizes da BJCP.

As cervejas controladas demonstraram o poder antioxidante proveniente do malte e do lúpulo, sendo maior nas cervejas do estilo *Oatmeal Stout* devido à utilização de maltes torrados que originam maiores concentrações de compostos fenólicos.

O mirtilo demonstrou ser um fruto interessante como adjunto na cerveja porque aumentou a concentração dos compostos com atividade antioxidante, sendo o aumento dependente das características da cerveja e do processamento do mirtilo. Maiores quantidades de mirtilo com tratamento térmico contribuíram de forma significativa para o aumento do poder antioxidante e do teor de compostos fenólicos.

A adição do sumo de mirtilo, independente das cascas, aumenta a concentração de antioxidantes com capacidade de quelar íons metálicos (FRAP). Tendo em conta que a adição da casca do mirtilo não acrescenta vantagem antioxidante, seu uso sem a casca deve ser considerado em primeiro lugar na formulação das cervejas com mirtilo para maximizar a capacidade do seu efeito.

A adição de mirtilo na cerveja diminui o decaimento dos compostos antioxidantes, prevenindo seu envelhecimento durante o armazenamento. Mas, o armazenamento em baixas temperaturas demonstrou ter maior decaimento, pois promove-se a precipitação de compostos fenólicos por complexação com proteínas. Enquanto que os antioxidantes com capacidade de quelar íons metálicos (FRAP), a eficiência aumenta com o abaixamento da temperatura de armazenamento.

Maiores teores alcoólicos diminuíram a capacidade de sequestrar radicais livres (DPPH) nas cervejas com adição de mirtilo, após 7 meses de armazenamento. Assim, o aumento do teor alcoólico de uma cerveja conduz ao aumento do decaimento do poder antioxidante e da concentração de compostos fenólicos. Para maximizar o poder antioxidante, é interessante manter os níveis de álcool em valores mais baixos nas cervejas.

Embora os consumidores prefiram cervejas menos ácidas, e não consigam perceber as diferenças na quantidade de mirtilo nas cervejas, o uso de matérias-primas locais como ingredientes do fabrico de cerveja, e adicionalmente com maior poder antioxidante, aumentam o interesse de consumo. No mercado brasileiro, isso dá uma vantagem competitiva ao estilo *Catharina Sour*.

7 Perspetivas futuras

Neste trabalho não foi utilizado dióxido de carbono para purgar o oxigénio durante as transferências de cerveja. Em futuros desenvolvimentos, esta utilização é recomendada de forma a minimizar a etapa de iniciação das reações de oxidação.

O controle da concentração dos íons metálicos e da concentração de oxigénio na cerveja final é de extrema importância, pois podem interferir nas características da cerveja de forma indesejável, não mantendo um padrão de qualidade do produto. Do ponto de vista da tecnologia das cervejeiras artesanais, a concentração de oxigénio é mais fácil de controlar do que a concentração dos íons metálicos, uma vez que não dependem do fornecedor das matérias-primas, como do malte e da água.

No caso de as matérias-primas possuírem uma elevada concentração de ferro, é preferível otimizar as condições que favorecem os compostos antioxidantes com capacidade de quelar iões metálicos, mas sendo o cenário ideal, a escolha das condições que maximize a concentração de todos os compostos com poder antioxidante.

Seria interessante construir um modelo matemático dos resultados, sendo que para tal seria necessário realizar réplicas dos experimentos realizados, de forma a validar os resultados. Para além disso seria também importante implementar os diferentes fatores estudados nas quatro cervejas diferentes produzidas, assim como a combinação entre eles. Sempre que possível, deverá ser considerado no desenho experimental o ponto central dos fatores, de modo a ajustar melhor o modelo. Embora o estudo do PCA não tenha representado todas as variâncias das amostras, pode ser utilizado para analisar de um modo geral a interação das variáveis em estudo, sendo aconselhável a sua realização em trabalhos futuros.

A análise do envelhecimento deveria ser feita com todas as amostras, uma vez que a formulação de cada cerveja impacta os resultados do mesmo. Desse modo, os resultados do envelhecimento natural do Experimento 1 não podem ser extrapolados para os outros Experimentos, já que as características de cada cerveja são diferentes (pH, teor de álcool, etc.) e impactam o decaimento do poder antioxidante e dos compostos fenólicos, como foi verificado para o caso do teor alcoólico, por exemplo.

8 Referências

- Antunes, L. E. C; Raseira, M. C. B. **Cultivo do mirtilo (*Vaccinium spp*). Clima temperado. Sistemas de produção.** *Embrapa*, Setembro, 2006.
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). **Report of the Subcommittee on Spectrophotometric Analysis of Proteins in Hopped Wort and Beer.** *Journal* 63:218-219, 2005.
- American Society of Brewing Chemists (ASBC). **Methods of analysis, beer 23.** Bitterness Units Approved 1968, rev. 2018.
- Benzie, I.; Strain, J. **The ferric reducing Ability of plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power: The FRAP Assay”.** *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76. 1996.
- Beer Judge Certification Program (BJCP). **Beer Style Guidelines.** Disponível em: <http://www.bjcp.org/style/2015/beer/>. Acesso em: 1/5/2019
- Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30. 1995.
- Briggs, D. E.; Boulton, C. A.; Brookes, P. A.; Stevens, R. **Brewing: Science and Practice.** 1ª edição, p.543-561. 2004.
- BrewUnited's Grain Database. Disponível em: http://www.brewunited.com/grain_database.php. Acesso em: 25/04/2019.
- Callemien, D.; Collin, S. **Structure, organoleptic properties, quantification methods and stability of phenolic compounds in beer: a review.** *Food Reviews International*, 26, p. 1-84, 2009.
- Cechovská, L.; Konecny, M.; Velisek, J.; Cejpek, K. **Effect of Maillard reaction on reducing power of malts and beers.** *Czech Journal of Food Sciences* v.30, 6, 2012.
- Covenin 2616:2001. **Malta y cerveza. Métodos de ensayo.** 2ºEd. Venezuela. 2001.
- Da Rocha, F. I. G. **Avaliação da cor e da atividade antioxidante da polpa e extrato de mirtilo (*Vaccinium myrtillus*) em pó.** *Tese de Doutorado.* Universidade Federal de Viçosa. 2009.
- Decker, E. A., Elias, R. J.; McClements, D. J. (ed.). **Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications: understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity.** *Elsevier*, p. 13-19, 2010.
- Dutcosky, S. D. **Análise sensorial de alimentos.** *Universitária Champagnat.* 3 ed., p.249-250, 2011.
- Escola Superior de Cerveja e Malte. **Usar ou não BeerSmith na produção de cervejas.** Disponível em: <http://cervejaemalte.com.br/blog/usar-ou-nao-beer-smith/>. Acesso em 22/10/2019
- Foti, Mario C. **Antioxidant properties of phenols.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 59,1673-1685, 2007.
- Freitas G.L.; Kuskoki, E. M.; Gonzaga, L.; Fett, R. **Avaliação da atividade antioxidante de diferentes cervejas aplicando os métodos ABTS e DPPH.** *Alimentos e Nutrição*, v.17, p.303-307, 2006.
- Gerhauser, C. **Beer constituents as potential cancer chemopreventive agentes.** *European Journal of Cancer*, v.41, p. 1941–1954, 2005.
- Ghiselli, A. *et al.* **Beer increases plasma antioxidant capacity in humans.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 11, p. 76-80, 2000.
- Grains, Extracts & Sugars. Disponível em: <http://beersmith.com/Grains/Grains/GrainList.htm>. Acesso em: 16/04/2019.
- Instituto Adolfo Lutz (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** 4ª. ed. 1ª edição digital. São Paulo, 2008.

- Kalt W.; McDonald J.E., Donner H. **Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity of processed lowbush blueberry products.** *Journal of Food Science*, 2000.
- Lee, J.; Durst R. W.; Wrolstad, R. E. **Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study.** *Journal of AOAC International* 88, 1269-1278, 2005.
- Lewis, M. J.; Bamfort, C. W. **Essays in Brewing Science.** *Springer*, p. 3-13, 2006.
- Li, H.; Liu, Fang; He, X. *et al.* **A study on kinetics of beer ageing and development of methods for predicting the time to detection of flavour changes in beer.** *Journal of the Institute of Brewing* 121, p. 38-43, 2015.
- Maskell, P. D.; Speers, R. A.; Maskell, D. L. **Improving uncertainty in Widmark equation calculations: Alcohol volume, strength and density.** *Science & Justice*, 57, p. 321-330, 2017.
- Mazza, G.; Miniati, E. **Anthocyanins in fruits, vegetables and grains.** *CRC Press*, p. 10-19, 1993
- Miller, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.** *Analytical Chemistry* 31, 426-428, 1959.
- Moura, A; Silva, V; Oldoni, T; *et al.* **Optimization of phenolic compounds extraction with antioxidant activity from açai, blueberry and goji berry using response surface methodology.** *Emirates Journal of Food and Agriculture*, p. 180-189, 2018.
- Palmer, J. J. **How to brew: everything you need to know to brew beer right the first time.** *Brewers Publications*, 2006.
- Pohl, P. **Determination and fractionation of metals in beer: A review.** *Food Additives and Contaminants*, 25, p. 693–703, 2008,.
- Pokorny, J; Yanishlieva, N.; Gordon, M (ed.). **Antioxidants in food.** *Food Science and Technology*, cap.1, p.2-5, 2001.
- Preedy, Victor R (ed.). **Processing and Impact on Antioxidants in Beverages.** *Elsevier*, p. 15-24, 2014.
- Reque, P. M.; Steffens, R. S.; Silva, A. M. D. *et al.* **Characterization of blueberry fruits (*Vaccinium spp.*) and derived products.** *Food Science and Technology*, 34, p. 773-779, 2014.
- Schuler P. **Natural antioxidants exploited commercially.** *Food Antioxidants*, p. 99-170, 1990.
- Segtowick, E.; Brunelli, L.; Venturini Filho, W. **Avaliação físico-química e sensorial de fermentado de acerola.** *Brazilian Journal Food Technology*, 16, p.147-154, 2013.
- Singleton, V. L.; Rossi, J. A. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagent.** *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158, 1965.
- Smith, Bradley J. **Home Brewing with BeerSmith: How to Brew and Design Great Beer at Home,** *BeerSmith LLC*, cap 3, p. 44-46, 2010.
- Tafulo, P.; Queirós, R *et al.* **Control and comparison of the antioxidant capacity of beers.** *Food Research International*, v. 43, n. 6, p. 1702-1709, 2010.
- White, C.; Zainasheff, J. **Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation.** *Brewers Publication*, p.17-18; 34-38, 2010.
- Zhao, H.; Chen, W. *et al.* **Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers.** *Food Chemistry*, v. 119, p. 1150-1158, 2010.
- Zhao, H.; Sun-Waterhouse, D. **Interactions between proteins and polyphenols in beer.** *Reference Module in Food Science*, 2018.

9 Anexos

9.1 A1: Qualidade da água (Março/2019)-Florianópolis (BR)

Qualidade da água em **Março/2019** para:

Município: **Florianópolis**

Localidade: **Florianópolis**

Sistema: **Sia - Florianópolis**

Subsistema: **Florianópolis**

[[Selecionar Outra Localidade](#)]

Mês/Ano da Análise: --- Selecione --- ▼

INFORMAÇÃO DA QUALIDADE DA ÁGUA DISTRIBUÍDA

Decreto Presidencial Nº 5.440/05, Portaria Nº 2914/11 MS e Portaria Estadual Nº 421/16

1 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS			
PARÂMETROS/AMOSTRAS	PORTARIA Nº 2914/11	REALIZADAS	EM CONFORMIDADE
TURBIDEZ	169	196	170
COR APARENTE	53	196	157
CORO RESIDUAL	169	196	195
FLUOR	16	38	36

2 - CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS				
PARÂMETROS/AMOSTRAS	PORTARIA Nº 2914/11	REALIZADAS	EM CONFORMIDADE	ATENDIMENTO AO PADRÃO
COLIFORMES TOTAIS	169	189	188	Sim
ESCHERICHIA COLI	169	196	196	Sim

CONCLUSÃO

EVENTUAIS ANÁLISES FORA DO PADRÃO FORAM REFEITAS E ACOMPANHADAS DE AÇÕES CORRETIVAS EM TEMPO HÁBIL, PARA GARANTIR A QUALIDADE DA ÁGUA, CONFORME PORTARIA DE CONSOLIDAÇÃO Nº5 /2017 MS, ANEXO XX.

9.2 A2: Ficha técnica de produção

FICHA TÉCNICA DE PRODUÇÃO-Experimento 1

Estilo: *Pilsen (German Pils)*

Densidade inicial: 1,049

Amargor: 26 IBU

Cor: 6 EBC

Brassagem

pH: 5,4

Maltes	Kg
Pilsen	8,00
TOTAL	8,00
Temperatura (°C)	Tempo (min)
66,0	60
76,0	10

Água	L
Brassagem	24,0
Lavagem dos grãos	28,0

Químicos	g
Ca ₂ Cl ₂ .H ₂ O	5,2
CaSO ₄ .2H ₂ O	4,5
ZnSO ₄	0,05

Fervura 35 L

Lúpulo	Quantidade (g)	Tempo (min)	IBU
Mosaic	35,0	60	25
Mosaic	5,0	10	1
TOTAL	40,0	60	26

Fermentação

Levedura	American Lager x 2
Temperatura	14°C

Engarrafamento

Carbonatação	5 g/L
Método	<i>Priming c/ glicose</i>

FICHA TÉCNICA DE PRODUÇÃO-Experimento 2

Estilo: *Catherina Sour*

Densidade inicial: 1,048

Amargor: 6 IBU

Cor: 6 EBC

Brassagem

pH: 5,4

Maltes	Kg
Pilsen	6,00
Trigo	3,00
TOTAL	9,00
Temperatura (°C)	Tempo (min)
66,0	60
76,0	10

Água	L
Brassagem	27,0
Lavagem dos grãos	35,0

Químicos	g
Ca ₂ Cl ₂ .H ₂ O	6,69
CaSO ₄ .2H ₂ O	5,79
ZnSO ₄	0,05

Fervura 43 L

Lúpulo	Quantidade (g)	Tempo (min)	IBU
Mosaic	15	20	6
TOTAL	15	60	6

Fermentação

Levedura	American Ale x 2
Temperatura	19°C

Engarrafamento

Carbonatação	5 g/L
Método	<i>Priming c/ glicose</i>

FICHA TÉCNICA DE PRODUÇÃO-Experimento 3

Estilo: *Strong Ale*

Densidade inicial: 1,062

Amargor: 50 IBU

Cor: 7 EBC

Brassagem

pH: 5,4

Maltes	Kg
Pale Pilsen	9,00
Carapils	2,00
TOTAL	11,00
Temperatura (°C)	Tempo (min)
66,0	60
76,0	10

Água	L
Brassagem	30,0
Lavagem dos grãos	35,0

Químicos	g
Ca ₂ Cl ₂ .H ₂ O	6,69
CaSO ₄ .2H ₂ O	5,79
ZnSO ₄	0,05

Fervura 44 L

Lúpulo	Quantidade (g)	Tempo (min)	IBU
Mosaic	45	60	27
Amarillo	45	60	21
Mosaic	10	5	1
Amarillo	10	5	1
TOTAL	110	60	50

Fermentação

Levedura	U-05 x 2
Temperatura	19°C

Engarrafamento

Carbonatação	5 g/L
Método	<i>Priming c/ glicose</i>

FICHA TÉCNICA DE PRODUÇÃO-Experimento 4

Estilo: *Oatmeal Sout*

Densidade inicial: 1,055

Amargor: 48 IBU

Cor: 66 EBC

Brassagem

pH: 5,4

Maltes	Kg
Pale Ale	8,00
Aveia (flocos)	1,50
Malte Crystal	0,50
Malte Chocolate	0,70
Cevada torrada	0,20
TOTAL	10,90

Água	L
Brassagem	30,0
Lavagem dos grãos	35,0

Químicos	g
Ca ₂ Cl ₂ .H ₂ O	6,69
CaSO ₄ .2H ₂ O	5,79
ZnSO ₄	0,05

Temperatura (°C)	Tempo (min)
52,0	15
66,0	60
76,0	10

Fervura 42 L

Lúpulo	Quantidade (g)	Tempo (min)	IBU
Mosaic	60	60	34
Mosaic	10	10	2
TOTAL	100	60	36

Fermentação

Levedura	T-58 x 2
Temperatura	19°C

Engarrafamento

Carbonatação	5 g/L
Método	<i>Priming c/ glicose</i>

9.3 A3: Curvas de calibração

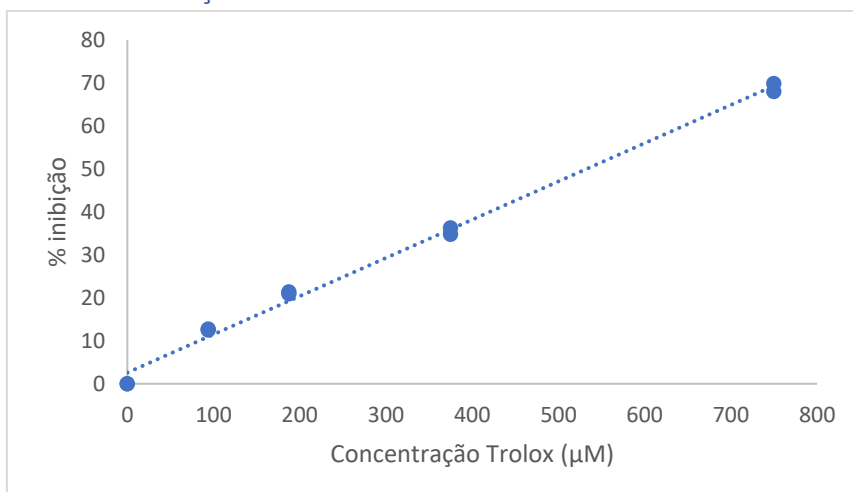


Figura 15- Curva de calibração do método DPPH: Concentração de Trolox (µM) em função da percentagem de inibição ($y=0,089x+2,25924$ e $R^2=0,995$).

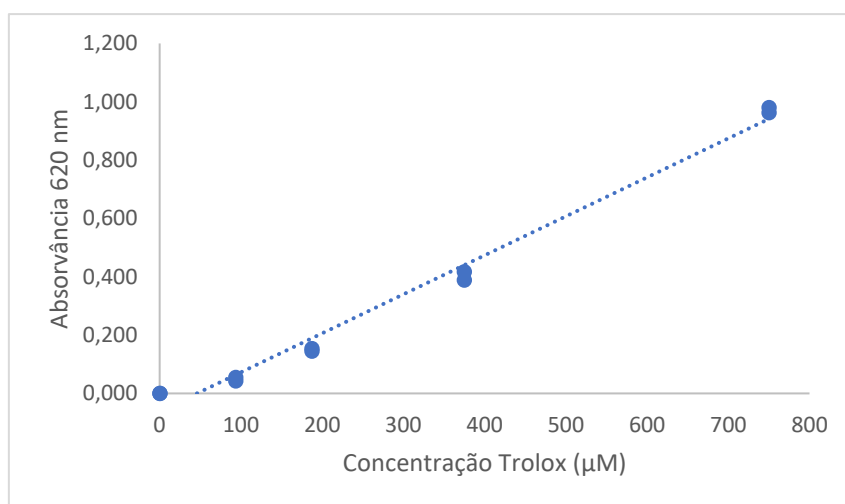


Figura 16-Curva de calibração do método FRAP: Absorvância a 620 nm em função da concentração de Trolox (µM) ($y=0,0013x-0,00614$ e $R^2=0,987$).

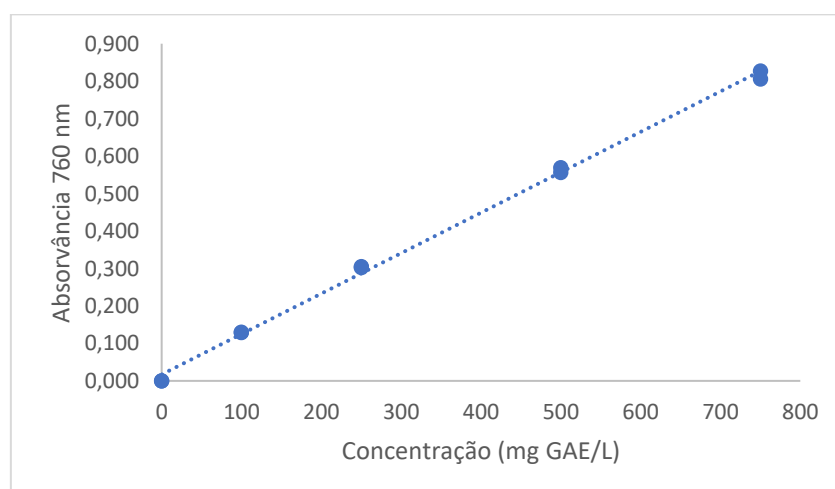


Figura 17-Curva de calibração do método Folin-Ciocalteu: Absorvância a 760 nm em função da concentração (mg GAE/L) ($y=0,0011x+0,0171$ e $R^2=0,998$).

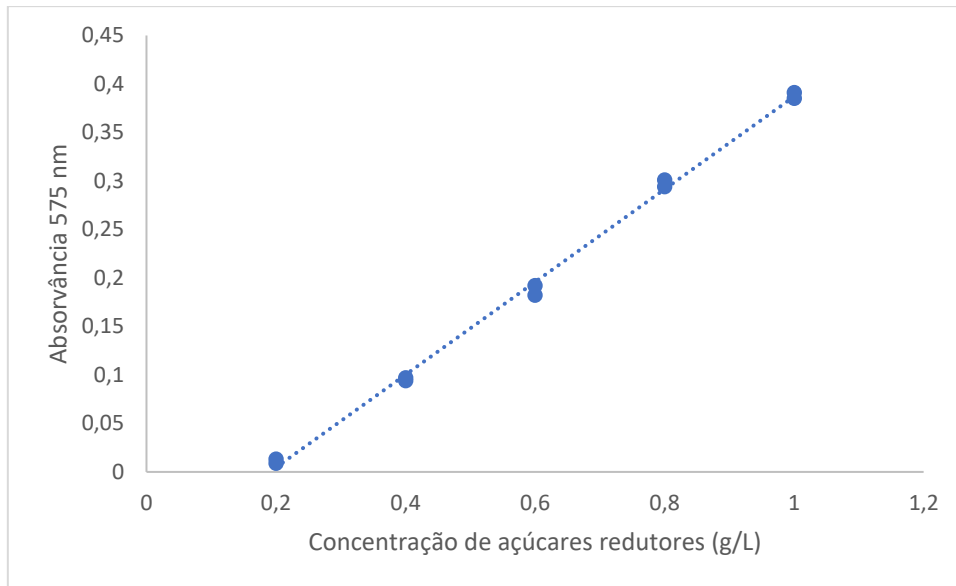


Figura 18-Curva de calibração para o método DNS: Absorvância a 575 nm em função da concentração de açúcares redutores (g/L) ($y=0,478x-0,091$ e $R^2=0,997$)

9.4 A4: Leveduras (*Saccharomyces*) e bactéria (*Lactobacillus brevis*)-Dados do fornecedor.



LEVTECK
TECNOLOGIA VIVA

Não se desenvolve em mostos com amargor acima de 7 IBU.
Não atenua o mosto.
Acidificação até pH 3,4.
NÃO OXIGENE O MOSTO

LACTOBACILLUS BREVIS

MODO DE USAR:
Equalizar a temperatura do sache com a temperatura do mosto. Inocular diretamente no mosto na temperatura próxima a 37 °C.
Manter a temperatura de 37 °C até atingir a acidificação prevista. Utilizar um sache para cada 20 litros de mosto.

Safale US-05

DRY ALE YEAST
Ingredients: Yeast, emulsifier (E491).
Packaged in a protective atmosphere, store cool and dry.
See packaging for best before end date and batch number. Manufactured in Belgium.

CHARACTERISTICS: American ale yeast producing well balanced beers with a very clear crisp end palate. Sedimentation: medium. Final gravity: low to medium.
Temperature range: 12-25°C (53.6-77°F) ideally 15-22°C (59-71.6°F).

DOSEAGE: 11.5 g in 20 to 30 litres.
PITCHING: Sprinkle into wort.

NET WEIGHT: 11.5 g

Fermentis
LESAFFRE FOR BEVERAGES
Division of S.I. Lesaffre
BP 3029 - 137 rue Gabriel Péri
F-59703 Maroix-en-Baroeul cedex - France

COB54-15-248605

Safbrew T-58

DRY BREWING YEAST
Ingredients: Yeast, emulsifier (E491).
Packaged in a protective atmosphere, store cool and dry.
See packaging for best before end date and batch number. Manufactured in Belgium.

CHARACTERISTICS: Speciality yeast selected for its estery somewhat peppery and spicy flavour development. Sedimentation: medium. Final gravity: high. Temperature range: 12-25°C (53.6-77°F) ideally 15-20°C (59-68°F).

DOSEAGE: 11.5 g in 20 to 30 litres.
PITCHING: Sprinkle into wort.

NET WEIGHT: 11.5 g

FERMENTIS A LESAFFRE DIVISION
Division of S.I. Lesaffre
BP 3029 - 137 rue Gabriel Péri
F-59703 Maroix-en-Baroeul cedex - France

82940 305 2156

COB54-11-258035

9.5 A5 Correlação das variáveis e o seu respetivo peso nas quatro componentes principais (PC1, PC2, PC3 e PC4).

Variável	Correlação entre variáveis				Peso			
	PC1	PC2	PC3	PC4	PC1	PC2	PC3	PC4
DPPH	0,790	0,390	0,331	-0,058	0,120	0,045	0,063	0,003
FRAP	0,747	0,041	0,350	-0,093	0,107	0,000	0,070	0,007
Folin-Ciocalteu	0,850	0,374	-0,347	0,063	0,138	0,041	0,069	0,003
Proteína	0,521	0,007	0,443	0,411	0,052	0,000	0,112	0,138
Acidez titulável	-0,119	-0,907	0,144	0,231	0,003	0,242	0,012	0,044
pH	0,102	0,913	-0,275	-0,055	0,002	0,245	0,043	0,002
Densidade	0,527	-0,515	-0,590	0,073	0,053	0,078	0,199	0,004
Sólidos totais	0,706	-0,374	-0,040	0,058	0,096	0,041	0,001	0,003
Antocianinas	0,747	-0,286	0,065	-0,470	0,107	0,024	0,002	0,181
Açúcares redutores	-0,039	-0,574	-0,416	-0,630	0,000	0,097	0,099	0,325
Álcool	-0,069	0,588	0,311	-0,525	0,001	0,102	0,055	0,226
L*	-0,911	0,103	-0,035	-0,074	0,159	0,003	0,001	0,004
a*	0,019	-0,527	0,668	-0,264	0,000	0,082	0,255	0,057
b*	-0,919	-0,010	0,178	-0,033	0,162	0,000	0,018	0,001

9.6 A6: Questionário da análise sensorial

ANÁLISE SENSORIAL DE CERVEJA CATHARINA SOUR DE MIRTILO

Teste sensorial realizado como parte da Dissertação de Mestrado "Avaliação do poder antioxidante em cerveja artesanal com mirtilo" do mestrando José Silva do Instituto Superior de Técnico (Universidade de Lisboa, Portugal).

Ingredientes: Água, Malte de cevada e de trigo, *Lactobacillus*, Levedura, Lúpulo, Ácido Láctico e Mirtilo.

SE VOCÊ FOR ALÉRGICO OU INTOLERANTE A ALGUM DOS COMPONENTES DA FÓRMULA, NÃO PROSSIGA O TESTE.

NOME (opcional): _____

IDADE: _____

SEXO: _____

Por favor, indique sua opinião sobre as seguintes características das DUAS amostras, segundo a seguinte escala:

- 1- Desgostei muitíssimo
- 2- Desgostei muito
- 3- Desgostei regularmente
- 4- Desgostei ligeiramente
- 5- Indiferente
- 6- Gostei ligeiramente
- 7- Gostei regularmente
- 8- Gostei muito
- 9- Gostei muitíssimo

Característica	Amostra	
	473	252
Aparência / Cor		
Aroma		
Sabor		
Corpo		

Avalie as amostras adicionalmente quanto a ACIDEZ e PERCEPÇÃO DE FRUTA e responda:

1- Quanto à ACIDEZ, a amostra 473 está:

pouco ácida na acidez certa muito ácida

2- Quanto ao PERCEPÇÃO DE FRUTA, a amostra 473 está:

Pouca fruta na medida certa Muita fruta

3- Quanto à ACIDEZ, a amostra 252 está:

pouco ácida na acidez certa muito ácida

4- Quanto ao PERCEPÇÃO DE FRUTA, a amostra 252 está:

Pouca fruta na medida certa Muita fruta

Por favor, responda às seguintes questões:

- 1- Quantas cervejas *Catharina Sour* diferentes (tipos) você já provou/consumiu?
() Foi a primeira vez () Até 5 tipos () Mais de 5 tipos
- 2- A informação "Cerveja com antioxidantes naturais" estimularia você a consumir/comprar este produto?
() SIM () NÃO
- 3- A informação "Cerveja elaborada com produtos regionais" estimularia você a consumir/comprar este produto?
() SIM () NÃO

COMENTÁRIOS: _____

Muito obrigado pela sua participação!

Agradecimentos:
Universidade Federal de Santa Catarina
Instituto Superior de Técnico
Cervejaria Kairós

9.7 A7: Propagação de desvios

Propagação de desvios em soma e subtração:

Sejam $A = a \pm \Delta a$ e $B = b \pm \Delta b$. Para a soma e subtração destas duas grandezas temos:

$$S = A + B = s \pm \Delta s$$

e

$$P = A - B = p \pm \Delta p$$

onde definimos:

$$\text{para a soma: } s = a + b, \quad \Delta s = \Delta a + \Delta b$$

$$\text{para a subtração: } p = a - b, \quad \Delta p = \Delta a + \Delta b$$

Propagação de desvios em multiplicação e divisão:

Sejam $A = a \pm \Delta a$ e $B = b \pm \Delta b$. Para a multiplicação e divisão destas duas grandezas temos:

$$M = A \cdot B = m \pm \Delta m$$

e

$$D = A/B = d \pm \Delta d$$

onde definimos:

$$\text{para a multiplicação: } m = a \cdot b, \quad \Delta m = m \cdot (\Delta a/a + \Delta b/b)$$

$$\text{para a divisão: } d = a/b, \quad \Delta d = d \cdot (\Delta a/a + \Delta b/b)$$