



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

João Olavo Figueiredo Quelhas

Avaliação do processo de *dry-hopping* durante a maturação de cervejas
artesaniais

São José do Rio Preto - SP
2017

João Olavo Figueiredo Quelhas

Avaliação do processo de *dry-hopping* durante a maturação de cervejas artesanais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi

São José do Rio Preto - SP
2017

Quelhas, João Olavo Figueiredo.

Avaliação do processo de *dry-hopping* durante a maturação de
cervejas artesanais/ João Olavo Figueiredo Quelhas. -- São José do Rio
Preto, 2017

60 f. : il., tabs.

Orientador: Vanildo Luiz Del Bianchi

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Tecnologia de alimentos. 2. Cerveja artesanal. 3. Bebidas
fermentadas. 4. Lupulagem a frio 5. Análise sensorial I. Bianchi, Vanildo
Luiz Del. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".
Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.4

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

João Olavo Figueiredo Quelhas

Avaliação do processo de *dry-hopping* durante a maturação de cervejas
artesaniais

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Vanildo Luiz Del Bianchi
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Conti e Silva
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Antônio Roberto Giriboni Monteiro
UEM – Maringá

São José do Rio Preto - SP
17 de Março de 2017

*Aos meus amados pais,
Maria Luisa de C. F. Quelhas e José Eduardo do Canto Quelhas
e a todos que colaboraram com a minha educação e formação,
Dedico*

RESUMO

O crescimento da produção de cerveja artesanal no Brasil e a consequente utilização de antigas técnicas de produção, como a lupulagem a frio (*dry-hopping*), esquecida pelas grandes empresas e pouco estudadas, abrem espaço para estudos sobre o melhoramento destas técnicas. Considerando a importância do lúpulo na produção de cerveja, principalmente seu alto teor de compostos considerados bioativos, por exemplo as procianidinas, a lupulagem a frio pode ser uma notável fonte de melhoramento nos aspectos sensoriais da cerveja, assim como no conteúdo de compostos com possíveis benefícios à saúde. Primeiramente, foi analisada a atividade antioxidante, pelos métodos de DPPH e ABTS, de sete variedades de lúpulo (*Cascade*, *Fuggie*, *Tradition*, *Saaz*, *Centennial*, *Herkules* e *Magnum*), com a finalidade de escolher uma para ser utilizada na lupulagem a frio. O *Cascade* foi selecionado para utilização na lupulagem a frio, principalmente por ser o atualmente o lúpulo mais produzido e consumido mundialmente. A produção das cervejas se diferenciou apenas na etapa da maturação, onde ela foi dividida em 17 recipientes. Cada cerveja maturou sob diferentes temperaturas (de 0 a 10°C), tempos de contato do lúpulo com a cerveja (de 0 a 20 dias) e concentrações de lúpulo (de 1,5 a 3 gL⁻¹), seguindo um delineamento composto central rotacional, com três repetições do ponto central. As 17 cervejas foram analisadas físico-quimicamente em relação ao extrato original/primitivo, extrato aparente, atenuação aparente, teor alcoólico, amargor, cor, pH, turbidez, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e ABTS). Foi realizada também uma análise sensorial, avaliando aceitação pela cor, aroma, sabor e amargor, além da aceitação global. As variáveis analisadas durante a lupulagem a frio não apresentaram influência no produto final em relação as análises físico-químicas e a aceitação sensorial.

Palavras-chave: Lupulagem a frio. Lúpulo. Aceitação sensorial.

ABSTRACT

The growth of craft beer production in Brazil and the consequent use of old production techniques, such as dry-hopping, forgotten by the large companies and little studied, open space for studies to improve these techniques. Considering the importance of hops in beer production, especially their high content of compounds considered bioactive, for example procyanidins, dry-hopping might be a notable source of improvement in the sensorial aspects of beer, as well as in the content of possible healthy compounds. Firstly, the antioxidant activity of seven hop varieties (Cascade, Fuggle, Tradition, Saaz, Centennial, Herkules e Magnum) was analyzed by DPPH e ABTS, in order to choose one to be used in the dry-hopping. Among the analyzed hops, the Cascade type was selected and, therefore, used during the dry-hopping process, mainly because it is currently the most produced and consumed hop worldwide. The brewing process was the same until the maturation, when the beer was divided into 17 containers. Each beer matured under different temperatures (from 0 to 10°C), time of contact between beer and hop (from 0 to 20 days) and hop concentration (from 1,5 to 3 gL⁻¹), following a central rotational design, with three replicates of the central point. The 17 beers submitted to physicochemical analysis as original/primitive extract, apparent extract, apparent attenuation, alcohol content, bitterness, color, pH, turbidity, total phenolic compounds and antioxidant activity (DPPH and ABTS). A sensory analysis was also implemented, evaluating the attributes: color, aroma, flavor, bitterness and global acceptance. The variables analyzed during dry-hopping did not show any influence on the final product in the physical-chemical analysis and sensory acceptance.

Keywords: Dry-hopping. Hop. Sensory acceptance.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Polifenóis do lúpulo.....	18
Figura 2 - Fluxograma da fabricação das cervejas	26
Figura 3 - Questionário inicial.....	32
Figura 4 - Ficha da análise sensorial	32
Figura 5 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a turbidez das 17 cervejas em função do tempo e da temperatura	40
Figura 6 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a aceitação do aroma sensorial das 17 cervejas em função da concentração e da temperatura	42
Figura 7 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a aceitação do amargor das 17 cervejas em função do tempo e da temperatura	45
Figura 8 - Análise de componentes principais	48

Lista de tabelas

Tabela 1 - Formulações das cervejas	25
Tabela 2 - Descrição dos tratamentos aplicados às amostras de cerveja	27
Tabela 3 - Atividade antioxidante por DPPH e ABTS dos lúpulos selecionados*	34
Tabela 4 - Análises físico-químicas das 17 cervejas*	38
Tabela 5 - Análise de variância do modelo da turbidez	39
Tabela 6 - Análise de variância do modelo da aceitação sensorial do aroma	41
Tabela 7 - Média e desvio padrão das notas da aceitação sensorial do aroma	43
Tabela 8 - Análise de variância do modelo da aceitação sensorial do amargor	44
Tabela 9 - Média e desvio padrão das notas da aceitação sensorial do amargor	46
Tabela 10 - Média das notas da análise de aceitação global, da cor e do sabor	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1. Cerveja.....	15
3.2. Consumo de cerveja.....	16
3.3. Processamento da cerveja	17
3.4. Lúpulo.....	17
3.4.1. Polifenóis no lúpulo	18
3.4.2. Lúpulo na cerveja	20
3.4.3. <i>Dry-hopping</i> (lupulagem a frio)	22
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1. Seleção do lúpulo	24
4.2. Fabricação da cerveja	24
4.3. Planejamento experimental	27
4.3.1. Análise estatística	28
4.4. Análises físico-químicas das 17 cervejas	29
4.4.1. Extrato original / primitivo	29
4.4.2. Extrato aparente	29
4.4.3. Atenuação aparente	29
4.4.4. Teor alcóolico	29
4.4.5. Amargor.....	29
4.4.6. Cor.....	30
4.4.7. pH.....	30
4.4.8. Turbidez.....	30
4.4.9. Compostos fenólicos totais.....	30
4.4.10. Atividade antioxidante medida por DPPH.....	31
4.4.11. Atividade antioxidante medida por ABTS	31
4.5. Análise sensorial	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Escolha do lúpulo a ser utilizado na lupulagem a frio.....	34
5.2. Análises físico-químicas.....	35

5.3. Análise Sensorial.....	40
5.3.1. Aroma	41
5.3.2. Amargor	43
5.3.2. Cor, sabor e aceitação global.....	46
5.3.3. Análise de componentes principais	48
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICE A	59

1. INTRODUÇÃO

Cerveja é uma das bebidas mais antigas de que se tem registro no mundo. Existem relatos do antigo Egito de uma bebida similar ao que, atualmente, chamamos de cerveja.

A princípio, a cerveja era apenas uma bebida fermentada de grãos maltados, principalmente a cevada. Os monges europeus após dominarem a técnica de produção começaram a buscar novas alternativas e estudar mais sobre o processo. Assim, durante muitos anos foram testados inúmeros produtos para dar mais sabor e aroma à cerveja. Um dos mais famosos era a o *gruit*, que consistia em uma mistura de ervas, que podia variar de produtor para produtor. Após testarem uma grande gama de ervas, o lúpulo (*Humulus lupulus* L., Cannabinaceae) surgiu como a preferida entre os cervejeiros, por sua alta capacidade de fornecer aroma e amargor, além de prolongar a manutenção da qualidade sensorial da cerveja, devido principalmente a sua atividade bacteriostática, que não era conhecida na época.

No começo do século XVI, com o intuito de padronizar a produção cervejeira, os alemães redigiram a primeira lei alimentar do mundo (*Reinheitsgebot*), mantendo como matéria-prima padrão para a produção de cerveja: malte, lúpulo e água. Somente muitos anos depois foi descoberto que as leveduras eram as responsáveis pela fermentação e assim foram adicionadas à lei como matéria-prima essencial da cerveja. Enquanto o malte é responsável principalmente pela cor e pelo corpo da cerveja, o lúpulo fornece o aroma, sendo também, na maioria dos estilos de cerveja, a principal matéria-prima responsável pelo sabor da bebida.

A parte da planta do lúpulo utilizada nas cervejarias são as inflorescências femininas, podendo ser *in natura* (flor) ou em *pellets*, os quais consistem em um concentrado da flor seca. Hoje em dia pode-se encontrar também óleos extraídos do lúpulo para utilizações mais específicas. O lúpulo pode ser dividido em dois grupos: os de amargor, que possuem maior quantidade de α -ácidos, e os aromáticos, os quais possuem mais compostos aromáticos, ou seja, mais resinas e óleos.

O lúpulo é adicionado essencialmente durante a fervura do mosto. Contudo ele pode ser também adicionado em outras etapas da produção cervejeira, como logo após o término da fermentação, na maturação, dentro do barril, como uma camada filtrante durante a extração do chope, entre outros métodos. As técnicas de utilização do lúpulo a baixas temperaturas são denominadas de *dry-hopping* ou

lupulagem a frio. Elas são em sua maioria originárias da Inglaterra no século XIX, porém com o passar do tempo foram esquecidas pelos cervejeiros.

Atualmente, devido ao surgimento dos cervejeiros artesanais (*craft brewers*), estas técnicas ganharam força e estão sendo utilizadas até por grandes produtores. Contudo, ainda existem muitos poucos relatos sobre qual seria a melhor forma de efetuar esta técnicas em relação a sua influência na aceitação sensorial e seu efeito físico-químico no produto final.

Os principais compostos relacionados ao amargor da cerveja (iso- α -ácidos) não são formados quando o lúpulo entra em contato com a cerveja a baixas temperaturas, com isso o *dry-hopping* possivelmente não influenciará no amargor da bebida. Por outro lado, os compostos aromáticos são transmitidos à bebida ao realizar-se esta técnica, tornando assim a cerveja mais aromática e podendo aumentar a aceitação sensorial do produto.

Fora isso, existem inúmeros estudos sobre o poder antioxidante do lúpulo e seus possíveis efeitos benéficos à saúde. A flor do lúpulo já foi utilizada para tratar uma variedade de doenças e ainda é utilizada contra insônia, distúrbios do sono e ansiedade, seja na forma de chá ou extratos alcoólicos. Assim, a adição do lúpulo na maturação da cerveja, ou seja, a realização do *dry-hopping*, poderá aumentar a capacidade antioxidante do produto e, portanto, produzir uma bebida com um teor maior de compostos de possíveis benefícios a saúde.

Na cerveja, o lúpulo contribui com aproximadamente 20% do total dos polifenóis presentes no produto. Dentre os polifenóis oriundos do lúpulo destacam-se os prenilados de chalcona, sendo alguns encontrados apenas nesta planta e podem ser transmitidos à cerveja. Já as procianidinas do lúpulo interferirão nas características sensoriais da bebida, principalmente na cor e turbidez, por reagirem com as proteínas e formar precipitados, além de fornecerem uma adstringência e um amargor característicos.

Portanto, o presente trabalho teve como foco avaliar físico-quimicamente e sensorialmente as alterações provocadas pela utilização do processo de *dry-hopping* durante a maturação de cervejas artesanais, em relação ao tempo de contato do lúpulo com a bebida, temperatura de maturação do produto e a concentração utilizada de lúpulo nesta etapa da produção.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar como o processo de *dry-hopping* em cerveja artesanal pode afetar as características físico-químicas e a aceitação sensorial do produto final.

2.2. Objetivos específicos

Avaliar a atividade antioxidante por DPPH e ABTS de sete variedades de lúpulo e selecionar uma para a utilização na lupulagem a frio da cerveja.

Produzir cervejas variando, durante a maturação com lupulagem a frio, os seguintes parâmetros: a temperatura da cerveja, o tempo de contato entre a cerveja e o lúpulo e a concentração de lúpulo adicionado ao processo de lupulagem a frio.

Avaliar a influência destas variáveis independentes da lupulagem a frio na cervejas em relação ao extrato original/primitivo, extrato aparente, atenuação aparente, teor alcoólico, amargor, cor, pH, turbidez, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante (DPPH e ABTS).

Avaliar a influência das mesmas variáveis independentes da lupulagem a frio na aceitação sensorial das características: cor, aroma, sabor, amargor e aceitação global das cervejas produzidas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Cerveja

Mesmo a palavra cerveja tendo sua origem no latim *bibere* (beber), há relatos de sua produção em povos mais antigos, por exemplo os Sumérios e Egípcios. Contudo, até que houvesse uma forte pesquisa e avanços na produção de cerveja, principalmente com a utilização do lúpulo como matéria-prima, o vinho ainda era a bebida preferida na maioria das civilizações da época (EßLINGER; NARZIß, 2009). No Brasil, a cerveja é definida como a bebida fermentada do mosto à base de malte de cevada e água, com adição de lúpulo, podendo ser adicionadas outras matérias-primas de origem vegetal (BRASIL, 2009).

As características de cada estilo de cerveja são diferenciadas pela matéria-prima utilizada, ou seja, as diferentes combinações dos tipos de malte, de lúpulo e da levedura para a produção de cerveja são responsáveis pela diferenciação dos seus estilos (WUNDERLICH; BACK, 2009).

O malte pode alterar algumas características da bebida, como cor, aroma e sabor. Seu papel principal é fornecer os açúcares que serão fermentados pela levedura, através do amido e das enzimas. Além do fornecimento de matéria-prima para a formação do álcool, o malte contribui com proteínas, as quais influenciarão na espuma e na turbidez da cerveja (NARZIß, 2013; EßLINGER, 2009). A utilização e combinação dos diferentes tipos de malte escuro podem gerar uma incontável variedade de cores, sabores e aromas ao produto. As principais propriedades dos maltes escuros provém das reações de Maillard, que consiste em um processo de escurecimento não enzimático, a partir de reações entre carboidratos e proteínas. As reações de Maillard fornecem um aumento na atividade antioxidante do malte, durante a maltagem, e da cerveja, durante a mosturação, devido principalmente a formação de compostos como a melanoidina. Estes compostos influenciam na estabilidade da espuma, do aroma e sabor da bebida, e assim em sua qualidade sensorial (COGHE et al., 2005). Coghe et al. (2004) afirmam que, em geral, é aceito que os aldeídos da reação de Strecker e os compostos heterocíclicos da reação de Maillard possuem um impacto substancial no aroma e sabor de alimentos termicamente processados.

Embora o lúpulo seja utilizado em quantidades muito menores do que o malte

na produção de cerveja, sua contribuição é da mesma importância. Além de ser o principal responsável pelo aroma da cerveja, o lúpulo também influencia nas outras propriedades sensoriais da bebida, em grande parte devido aos polifenóis cedidos durante a fabricação da bebida. Fora isso, o lúpulo é o único responsável – através principalmente da isomerização dos α -ácidos durante a fervura – pelo amargor da cerveja. Esta planta ainda confere propriedades antibacterianas, ajuda na esterilização do mosto e na estabilidade da espuma da cerveja (ALMAGUER et al., 2014).

Em relação ao tipo de levedura utilizada tem-se a diferenciação entre as cervejas *ale* ou de alta fermentação e as *lager*, de baixa fermentação. As cervejas consideradas como as mais populares dentre as de alta fermentação são as de trigo e as cervejas *pale ale*. Contudo a maioria das cervejas produzidas hoje em dia é de baixa fermentação, como as Lagers e Pilsens (EßLINGER, 2009).

3.2. Consumo de cerveja

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no Brasil. E a partir do movimento das cervejas artesanais, o consumo e o acesso do consumidor aos diferentes estilos de cerveja aumentaram muito nos últimos anos (KIRIN, 2014). O segmento de mercado da cerveja artesanal está crescendo de forma inesperada nos últimos anos, representando nos Estados Unidos da América aproximadamente 6% do mercado total por volume e cerca de 10% por valor (ASCHER, 2012). Um outro lugar em que existe uma alta demanda por cervejas artesanais é a Europa, mesmo com a crise que afetou o mercado consumidor. Embora tenha ocorrido uma diminuição nas vendas de cerveja no mercado europeu, houve um aumento no valor das vendas, devido ao sucesso das cervejas especiais (DONADINI, 2016). No Brasil, não é diferente: há um aumento expressivo nos últimos anos na quantidade de produtores de cervejas. Segundo a Associação Brasileira de Microcervejarias (Abmic), as cervejas artesanais já estão reproduzidas em mais de 100 rótulos no Brasil (ABRAS, 2011).

3.3. Processamento da cerveja

Segundo Narziß (2013), a produção de cerveja a partir do malte ou de uma mistura de malte e outras matérias-primas, com ajuda da água, lúpulo e levedura, divide-se basicamente em duas partes:

1. A obtenção de um líquido rico em açúcar, o mosto;
2. A fermentação deste mosto pela levedura.

O processo de obtenção do mosto é separado em algumas etapas de trabalho:

1. Moagem do malte e adjuntos;
2. Produção de um extrato açucarado (mosto) através do processo chamado de mosturação, que consiste na gelatinização do amido do malte e posterior hidrólise do mesmo pelas enzimas presentes no malte, seguindo uma curva de temperatura;

3. Separação do mosto e das sobras do malte, casca e substâncias insolúveis, através de uma filtração;

4. Fervura do mosto filtrado com adição de lúpulo;
5. Resfriamento do mosto fervido à temperatura de fermentação.

O processo de fermentação pode também conter até três etapas, sendo elas:

1. Fermentação primária em tanques abertos ou fechados;
2. Fermentação secundária e maturação da cerveja em tanques fechados;
3. Filtração e envase da cerveja em barril ou garrafas.

3.4. Lúpulo

O lúpulo (*Humulus lupulus* L., Cannabinaceae) é uma planta cultivada quase que exclusivamente para o uso na produção cervejeira, sendo os principais produtores a Alemanha e os Estados Unidos. Nas cervejarias utiliza-se apenas as inflorescências das plantas fêmeas. Seu cultivo satisfatório requer algumas condições especiais como longos períodos de luz do dia, temperaturas de verão, chuvas anuais e solos férteis. Portanto, o cultivo de lúpulo ocorre apenas entre as latitudes 35° e 55° dos hemisférios norte e sul (ALMAGUER et al., 2014). Em 1986, Verzele comparou o gosto da cerveja sem lúpulo com o de uma limonada, mais doce

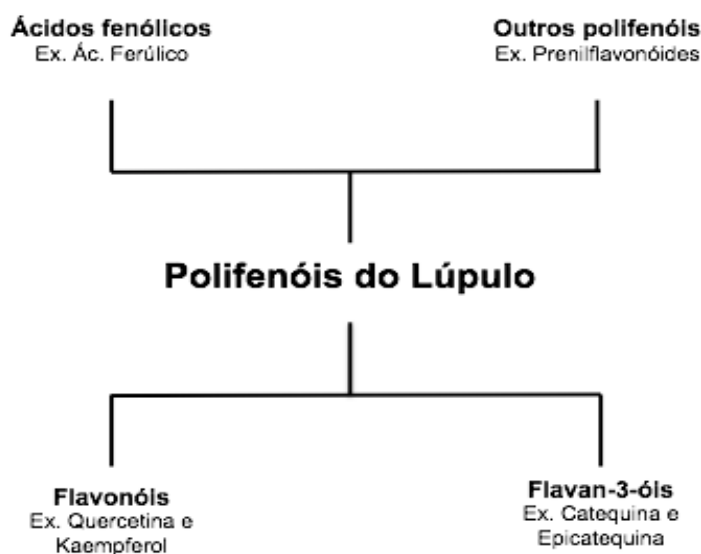
e ácida. Em seu trabalho, Verzele (1986) afirma ainda que o lúpulo, em especial, seus compostos de amargor mudam por completo o produto, tornando-o assim uma das principais matérias-primas da cerveja. Fora sua contribuição para o aroma e amargor da cerveja, o lúpulo também atua na formação e estabilidade da espuma e impede o crescimento de micro-organismos patogênicos (PIENDL; BIENDL, 2000).

3.4.1. Polifenóis no lúpulo

Os polifenóis podem ser considerados, dentre os compostos de origem vegetal, os de maior importância em relação à capacidade antioxidante. Isto se dá pelo fato de possuírem anéis fenólicos em suas estruturas, os quais, em sua maioria, possuem grupos hidroxílicos (HELMJA, 2007). Segundo Narziß (2013), é possível encontrar concentrações de 4 a 8% de polifenóis em peso seco no lúpulo, sendo possível determinar analiticamente até aproximadamente 100 compostos dentre esta fração. Estes valores são variáveis de acordo com a variedade, ano de cultivo, técnica de colheita e tempo de armazenamento do lúpulo (FORSTER, 1999; FORSTER et al., 1999; BENITEZ, 1997). A divisão destes compostos difere de acordo com cada autor, alguns os separam em grupos mais abrangentes, outros em grupos mais específicos.

Biendl (2009) dividiu os polifenóis do lúpulo entre quatro grupos: flavonóis (quercetina e kaempferol), flavan-3-ol (catequina, epicatequina), ácidos fenólicos (ácidos ferúlico) e outros polifenóis (Figura 1).

Figura 1 - Polifenóis do lúpulo



Enquanto a grande maioria dos polifenóis encontram-se majoritariamente nas brácteas e nas pétalas do lúpulo, os prenilflavonóides (xanthohumol) estão presentes nas glândulas de lupulina (KAVALIER et al., 2014; ROBERTS; WILSON, 2006).

Entre os polifenóis, existem alguns compostos que até hoje foram encontrados exclusivamente no lúpulo, sendo algumas dessas substâncias classificadas em multifídeos glicosídeos e prenilflavonóides, como o xanthohumol, desmetilxanthohumol, 6-prenilnaringenina e 8-prenilnaringenina. Existem vários estudos focados nos possíveis benefícios à saúde humana causados pela ingestão destes compostos e sua atividade fito-estrogênica, principalmente da 8-prenilnaringenina. (KARABÍN et al., 2015; BIENDL, 2009; CESLOVÁ et al., 2009; KOWALCZYK et al., 2013).

Em seu estudo, Tagashira et al. (1997) reportaram que um extrato de polifenóis do lúpulo apresenta maior efeito de prevenção a soprodonia induzida por *Mutans streptococci* do que um extrato com a mesma concentração de polifenóis de chá oolong. Wang et al. (2014), além de demonstrarem que os polifenóis do lúpulo são ricos em proantocianidinas, flavonóis e xanthohumol, também mostraram que estes polifenóis oferecem proteção à oxidação *in vitro* e *in vivo*, e contra mutagêneses.

Das diferenças entre tipos de lúpulos, pode-se citar que os aromáticos possuem maiores teores de polifenóis de baixo peso molecular do que os lúpulos de amargor (EßLINGER, 2009). Os polifenóis de baixo peso molecular como proantocianidinas, ácidos fenólicos e flavonóis compreendem apenas cerca de 20% do conteúdo de polifenóis do lúpulo (MAGALHÃES et al. 2010). Forster et al. (2002) separaram e compararam mais de 100 componentes de 11 variedades de lúpulo, principalmente polifenóis de baixo peso molecular como as proantocinidinas, visando encontrar uma relação entre as quantidades dos compostos e os tipos dos lúpulos. Em seu trabalho, foi possível evidenciar uma relação na composição química do lúpulo e sua área de plantio, portanto os polifenóis podem ajudar na diferenciação da variedade de lúpulo.

3.4.2. Lúpulo na cerveja

O lúpulo é tradicionalmente adicionado à cerveja principalmente no início da fervura do mosto, para que os α -ácidos possam ser isomerizados e fornecer o amargor ao produto, e adições mais tardias durante a fervura com lúpulos aromáticos. O momento da adição e quantidade a ser adicionada deve levar em conta alguns parâmetros como o perfil de aroma e amargor da cerveja a ser produzida, o tipo de lúpulo utilizado, tempo e temperatura do *whirlpool* (etapa de separação do mosto fervido e do *trub* decantado, que é o resíduo cervejeiro formado por proteínas, substâncias amargas, polifenóis e outras substâncias orgânicas). Como alternativa, porém não tão tradicionalmente utilizado, o lúpulo pode ser adicionado após a fermentação, processo este chamado de *dry-hopping* ou lupulagem a frio (EßLINGER, 2009; EßLINGER; NARZIß, 2009; BRIGGS et al., 2004).

O amargor da cerveja proveniente do lúpulo ocorre principalmente devido aos iso- α -ácidos, formados pela isomerização dos α -ácidos durante a fervura do mosto (MUDURA et al. 2008). As concentrações dos iso- α -ácidos na cerveja variam entre 15 e 100mgL⁻¹ (HEYERICK et al. 2003) e seu limite de percepção sensorial é de 5mgL⁻¹ (BAXTER; HUGHES, 2001). A fervura prolongada gera uma perda significativa dos iso- α -ácidos e conseqüentemente do amargor do produto (HUANG et al., 2013). Os iso- α -ácidos compreendem em sua maioria seis componentes: os trans- e cis-isômeros da isocohumulona, isohumulona e isoadhumulona (BRIGGS et al., 2004; DE COOMAN et al., 2000). O conjunto dos isômeros da isohumulona fornece mais amargor à cerveja do que apenas a trans-isohumulona (KAPPLER et al., 2010 b).

Os iso- α -ácidos e seus compostos reduzidos são responsáveis por mais de 85% do amargor da cerveja (KAPPLER et al., 2010 a; DE KEUKELEIRE et al., 1992). Todavia, Aron e Shellhammer (2010) citam trabalhos em que a adição de extratos de polifenóis do lúpulo influenciaram sensorialmente no amargor e na adstringência das cervejas. Os polifenóis de baixa e alta massa molecular podem ser os responsáveis pela adstringência. Enquanto os Flavan-3-óis, como a catequina e a epicatequina, podem também fornecer amargor a cerveja. Contudo, os flavan-3-óis podem intensificar o sabor de “metálico” e “medicinal” na bebida, mesmo prolongando a duração do amargor (Aron; Shellhammer, 2010).

Haley e Peppard (1983) tentaram identificar os compostos aromáticos do lúpulo na cerveja e Dresel et al. (2015) ainda afirmaram que o mecanismo de formação do aroma típico do lúpulo que se desenvolve durante a produção de cerveja, devido a sua baixa concentração, ainda não é totalmente conhecido.

Contudo, é sabido que o linalol se destaca como o composto de maior impacto em cervejas com aroma de lúpulo, podendo ser encontrado em concentrações de até 20µg em cervejas *lager* (EßLINGER, 2009; NARZIß, 2013).

Há também uma preocupação com os possíveis aromas indesejados, oriundos do lúpulo, que surgem na cerveja durante o armazenamento. O aroma indesejável surge principalmente por ésteres e grupos carbonil, mas também é influenciado por compostos sulfurosos, dicetonas, aldeídos e ácidos voláteis.

Os aromas do lúpulo são normalmente descritos como herbal, cítrico, frutado, gramíneo ou floral. Conhecer o tipo de aroma que cada lúpulo fornece à cerveja é muito importante para os cervejeiros, pois seu uso dependerá do estilo de cerveja que será produzido e da técnica de lupulagem a ser usada (ALMAGUER et al., 2014).

Uma das principais razões do lúpulo ser considerado uma das matérias-primas essenciais para produção de cerveja é o seu poder de inibição contra micro-organismos (KAPPLER et al., 2010 a). As resinas presentes no lúpulo, dentre elas destacam-se principalmente os α - e β -ácidos, são os responsáveis pela estabilidade da espuma, digestibilidade fisiológica e pelo poder de inibição microbiana (PREEDY, 2009). As formas não isomerizadas dos α -ácidos possuem de três a quatro vezes mais efeito antimicrobiano em alguns micro-organismos do que os iso- α -ácidos. Shimwell (1937) identificou que a ação antibacteriana dos compostos do lúpulo restringe-se apenas às bactérias Gram-positivas, sendo ineficaz contra bactéria Gram-negativas.

Em 1976, Fly e Chicoye relataram em seu trabalho a importância da presença das isohumulonas do lúpulo para a estabilidade e formação da espuma nas cervejas. Alguns anos depois, Bamforth (1985) atribuiu a capacidade das resinas do lúpulo em formar espuma, ao número de cadeias hidrofóbicas em suas moléculas; já Bamforth (2000) mostra que a espuma e suas características podem influenciar na expectativa dos consumidores em relação ao sabor da cerveja.

Shokribousjein et al. (2015) concluíram que um método eficiente para diminuir a espumação (*gushing*) - causado pelo contato das hidrofobinas com o CO₂ - é

submeter uma pequena quantidade de um extrato de lúpulo, contendo linalol e humulonas, moléculas estas apolares, por um campo magnético, antes de adicioná-lo ao mosto. O extrato cria uma interface no mosto com a qual as hidrofobinas interagem, inibindo seu contato com o gás carbônico.

3.4.3. *Dry-hopping* (lupulagem a frio)

A técnica de utilização do lúpulo a frio, mais comumente chamada pelo seu nome em inglês de *dry-hopping*, é discutida na literatura desde o início do século XIX. Contudo, até pouco tempo estudos científicos aprofundados nesta técnica eram escassos. Pouco é conhecido sobre as substâncias que são transmitidas do lúpulo para a cerveja durante este processo, ou seja como a lupulagem a frio afeta as propriedades físico-químicas, que tipo de lúpulo utilizar e como utilizá-lo (SCHÖNBERGER, 2012; SCHÖNBERGER; WIESEN, 2013; MITTER; COCUZZA, 2012). Sabe-se, porém, que ao utilizar o lúpulo depois da fervura, há um aumento no teor de α -ácidos na cerveja, o que auxilia na eliminação ou redução da concentração de metais e leva a um aumento da atividade antioxidante do produto (KUNZ et al., 2014).

Existem diversas técnicas de lupulagem a frio que são utilizadas principalmente pelos cervejeiros artesanais, mas grandes cervejarias também as utilizam e até desenvolveram algumas delas. Essas técnicas consistem principalmente em manter o lúpulo em contato com a cerveja durante um determinado tempo, seja apenas adicionando o lúpulo no tanque de maturação ou passando a cerveja por um tanque ou filtro preenchidos com lúpulo, o qual pode ser utilizado tanto em “pellets” como em flor (SCHÖNBERGER; WIESEN, 2013; MITTER; COCUZZA, 2012). Segundo Schönberger (2012), os cervejeiros artesanais americanos utilizam de 2 a 10 gL⁻¹ de lúpulo durante a lupulagem a frio. Por outro lado, Forster e Gahr (2013) analisaram o *dry-hopping* adicionando concentrações de lúpulo que variaram de 0,4 a 1 gL⁻¹ de cerveja.

Mitter e Cocuzza (2013) fizeram um dos primeiros estudos científicos sobre o *dry-hopping*, analisando algumas variáveis de processo como técnica, tempo, temperatura, quantidade e tipo de lúpulo utilizado e seu impacto nas concentrações de linalol e α -ácidos na cerveja. A temperatura mostrou-se como fator significativo para os teores de α -ácidos, sendo que à 20°C a extração foi maior e mais rápida,

porém apresentando um decréscimo da sua concentração no produto após o terceiro dia de maturação. Por outro lado, embora a extração de linalol tenha sido mais rápida à temperatura mais baixa (4°C), ao final da maturação as concentrações de linalol na cerveja foram iguais. A utilização do lúpulo em sacos finos mostrou ser menos eficiente do que deixar os lúpulos soltos no tanque. O tempo e a concentração não apresentaram impacto significativo nas concentrações de linalol e de α -ácidos, embora exista muitos outros compostos a serem estudados.

Forster e Gahr (2013) produziram cinco cervejas sendo uma padrão, ou seja sem lupulagem a frio, e outras quatro com lupulagem a frio. Os resultados mostraram maior concentração de α -ácidos e de compostos aromáticos nas cervejas com *dry-hopping*. Por exemplo o linalol, principal composto aromático do lúpulo foi encontrado em uma concentração de $38\mu\text{gL}^{-1}$ na cerveja controle, enquanto que em uma das cervejas com lupulagem a frio a concentração foi de $103\mu\text{gL}^{-1}$. A taxa de transferência de alguns compostos provenientes do lúpulo para a cerveja também foi alta, sendo de até 70% de alguns para alguns polifenóis. Dresel et al. (2015) revelaram que apenas o linalol e o geraniol apresentaram taxa de transferência significativa nas cervejas com *dry-hopping*, e que há um impacto no produto final devido a variedade utilizada.

Na análise sensorial realizada por Forster e Gahr (2013) foi avaliado a intensidade e qualidade do aroma, do corpo e do amargor com notas de 1 até 10, além de uma análise de preferência das cervejas. As cervejas com *dry-hopping* apresentaram maior distinção na intensidade de aroma de lúpulo, mas sem efeito na preferência, o corpo delas obtiveram maiores médias dentre os consumidores do que da cerveja padrão e para o amargor não foi possível notar diferença. Em outro estudo, Kunz et al. (2014), também evidenciaram, através de um painel de provadores treinados, médias significativamente menores para o aroma da cerveja controle em comparação com a cerveja com lupulagem a frio.

Portanto, a lupulagem a frio aumenta a concentração de α -ácidos, não afetando o amargor da cerveja, porém melhorando a estabilidade da espuma e diminuindo o risco de deterioração do produto por micro-organismos (EßLINGER, 2009; NARZIß, 2013).

Ainda assim, segundo Mitter e Cocuzza (2012), faz-se necessário elucidar melhor alguns parâmetros dos métodos de lupulagem a frio, dentre eles: a dosagem do lúpulo, o tempo de contato, a safra e o tipo de lúpulo a ser utilizado.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Seleção do lúpulo

Foram avaliadas sete variedades de lúpulo, obtidas em comércio especializado, em relação a suas atividades antioxidante (DPPH e ABTS). Foram escolhidos os lúpulos *Cascade* e *Fuggle* - ambos aromáticos - por serem lúpulos comumente usados para este fim entre os cervejeiros artesanais. Segundo Lermusieau et al. (2001), os lúpulos *Saaz*, de amargor, e o *Hallertau Tradition*, aromático, usualmente reconhecidos, apresentaram a melhor atividade antioxidante e, portanto, também foram avaliados. Fora isso, foram adicionados à pesquisa os lúpulos das variedades *Hallertau Magnum*, *Centennial* e *Herkules*, sendo todos lúpulos de amargor, pois são comumente utilizados nas grandes e micro cervejarias. Assim, a variedade com a melhor atividade antioxidante foi selecionada para ser utilizada no projeto.

Para as análises com os lúpulos, os mesmos foram misturados em água na proporção de 5gL^{-1} e a solução foi fervida por 30 minutos. Em seguida, as soluções foram resfriadas e filtradas para proceder às análises, citadas.

4.2. Fabricação da cerveja

O estudo foi realizado no Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos do Instituto Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp de São José do Rio Preto. Os maltes utilizados (Tabela 1) foram adquiridos de empresas diversas, com preferência ao produto nacional. Os lúpulos (Tabela 1) foram empregados na forma de "pellets" T-90. O fermento seco US-05 foi utilizado para produzir as cervejas.

A metodologia utilizada foi elaborada especialmente para esta pesquisa, visando a produção de uma cerveja que se aproxime dos padrões sugeridos pela Beer Judge Certification Program (BJCP) para cervejas do estilo *pale ale*.

As quantidades de cada matéria-prima (Tabela 1) foram determinadas de acordo com testes de produções anteriores. Os valores apresentados são indicados para a produção de 50L de cerveja, sendo que a primeira adição de lúpulo é o de

amargor, logo no início da fervura, e a segunda adição (aromático) faltando cinco minutos para o término da mesma.

Tabela 1 - Formulações das cervejas

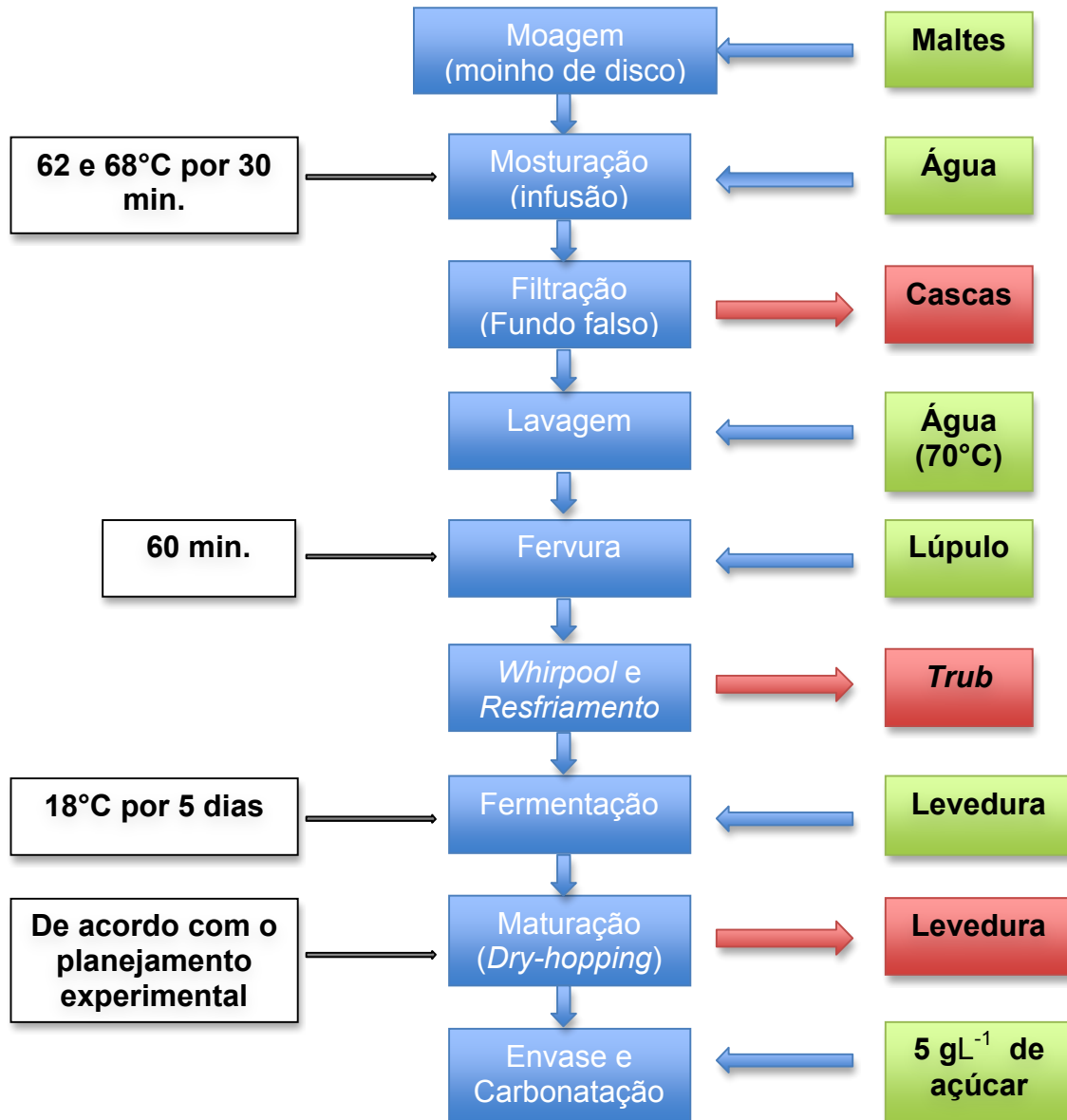
Matéria Prima para 50L	Peso
Malte Pilsen	5 kg
Malte Pale ale	5,6 kg
Malte Crystal 150	0,8 kg
Lúpulo Centennial (amargor - 60 min)	0,02 kg
Lúpulo Cascade (aromático - 5 min)	0,02 kg
Levedura US-05	23 g

O processo de fabricação foi realizado seguindo o fluxograma descrito na Figura 2, em que os três estilos de malte foram moídos concomitantemente, e posteriormente introduzidos à panela de mosturação juntamente com a água. A mosturação foi realizada por infusão, adotando as temperaturas de 62 e 68°C por 30 minutos cada, que segundo Narziß (2013) são as temperaturas ótimas da α e β -amilase.

Posteriormente o mosto foi transferido para uma panela com fundo falso perfurado que, com o auxílio das cascas, filtraram o mosto. A camada de casca remanescente na panela foi lavada com água a 70°C visando a extração dos açúcares que ainda estavam retidos.

O mosto já límpido foi fervido por 60 minutos e foram adicionados os lúpulos, sendo que o lúpulo *Centennial* foi adicionado logo no início da fervura, enquanto o *Cascade* foi acrescentado faltando 5 minutos para o término da fervura. Em seguida, foi realizado o processo de *whirlpool*, que consiste em gerar uma força centrípeta no líquido, forçando as moléculas mais pesadas, chamadas de *trub*, a se depositarem na parte central inferior da panela.

Figura 2 - Fluxograma da fabricação das cervejas



O líquido então foi resfriado a 18°C, ou seja à temperatura de fermentação, e transferido para o fermentador onde então foi adicionada a levedura. Ao término dos cinco dias de fermentação, houve a separação do excesso de levedura decantada no fundo do fermentador e a cerveja foi dividida e transferida para 17 baldes contendo oito litros cada, iniciando o processo de maturação que teve por duração 20 dias. Durante a maturação foi efetuado o processo de lupulagem a frio, que consiste na adição do lúpulo após a fervura, a baixas temperaturas. Neste caso, as 17 cervejas receberam diferentes dosagens de lúpulo, de 1,5 a 3 gL⁻¹, permanecendo em contato com a cerveja por diferentes tempos. Todas as cervejas maturaram por 20 dias, variando apenas o tempo de contato do lúpulo com a

cerveja, de 0 a 20 dias. A temperatura de maturação das bebidas também variou, de 0 a 10°C. Os três parâmetros, ou seja, temperatura da cerveja, concentração e tempo de contato do lúpulo, foram controlados de acordo com o planejamento experimental descrito a seguir.

Por fim, as cervejas foram envasadas em garrafas âmbar de 600mL com adição de 5gL^{-1} de açúcar visando a carbonatação por meio do gás carbônico liberado pela fermentação do açúcar pela levedura remanescente.

4.3. Planejamento experimental

A Tabela 2 mostra os tratamentos realizados, evidenciando os níveis testados dos fatores temperatura, tempo e concentração de lúpulo.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos aplicados às amostras de cerveja

Ensaio	Temperatura da cerveja (°C)		Tempo de contato com lúpulo (dias)		Concentração de lúpulo (gL^{-1})	
1	-1	2	-1	4	-1	1,8
2	-1	2	-1	4	1	2,7
3	-1	2	1	16	1	2,7
4	1	8	1	16	1	2,7
5	1	8	1	16	-1	1,8
6	1	8	-1	4	-1	1,8
7	-1	2	1	16	-1	1,8
8	1	8	-1	4	1	2,7
9	-1,68	0	0	10	0	2,25
10	0	5	-1,68	0	0	2,25
11	0	5	0	10	-1,68	1,5
12	1,68	10	0	10	0	2,25
13	0	5	1,68	20	0	2,25
14	0	5	0	10	1,68	3
15	0	5	0	10	0	2,25
16	0	5	0	10	0	2,25
17	0	5	0	10	0	2,25

As cervejas obtidas em cada tratamento foram avaliadas por sua aceitação sensorial, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade (CAAE: 52942216.2.0000.5466; comprovante nº 006454/2016). Além disso, elas foram submetidas, ainda, às análises de extrato original, extrato aparente, atenuação aparente, teor alcóolico, amargor, cor, pH, turbidez, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante por DPPH e ABTS. As análises físico-químicas foram realizadas em triplicata.

4.3.1. Análise estatística

A melhoria do processo de *dry-hopping* foi avaliada segundo um delineamento composto central rotacional, com três repetições do ponto central. Os dados das análises físico-químicas, a aceitação global, da cor e do sabor foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) ao nível de 5% de probabilidade para determinar se existia diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos. O Teste de Tukey foi utilizado quando a ANOVA apresentou diferença estatística entre os tratamentos. O programa Sistema para Análises Estatísticas SAEG (2007) foi utilizado para realizar as análises estatísticas.

Os resultados encontrados para turbidez, aceitação do aroma e amargor foram avaliados por meio de regressão linear testando o modelo quadrático completo com interação. Foram eliminados do modelo uma a uma as variáveis não significativas, a um nível de 5% de significância, sempre refazendo o modelo a cada eliminação de variável.

Foram considerados significativos os modelos que apresentaram valor de p menor que 0,5. Para a repetibilidade foram aceitos os modelos em que a falta de ajuste obteve valor de p maior que 0,1. Em relação ao ajuste do modelo foram aceitos os que apresentaram R^2 maior que 50%. A partir do modelo foram elaboradas as equações, superfícies de resposta e curvas de contorno a fim de elucidar melhor o comportamento das variáveis.

4.4. Análises físico-químicas das 17 cervejas

4.4.1. Extrato original / primitivo

Determinado segundo o método 9.4 da European Brewery Convention – EBC (2010), obtendo resultado em graus Plato (°P). No início da fermentação, foi retirada uma amostra de 150 mL que foi submetida à análise em densímetro.

4.4.2. Extrato aparente

Determinado segundo o método 9.4 da European Brewery Convention – EBC (2010), obtendo resultado em °P. No final da fermentação, foi retirada uma amostra de 150 mL que foi submetida à análise em densímetro.

4.4.3. Atenuação aparente

Determinado segundo o método 9.7 da European Brewery Convention – EBC (2010), obtendo resultado em %, que é a medida do quão completa foi a fermentação do mosto.

4.4.4. Teor alcóolico

Determinado segundo o método 9.2.3 da European Brewery Convention – EBC (2010), obtendo resultado em % de álcool (v/v).

4.4.5. Amargor

Determinado segundo o método 9.8 da European Brewery Convention – EBC (2010), obtendo o resultado em International Bitterness Units – IBU. O método consiste em esfriar a cerveja a 0°C, colocar 10 mL de cerveja num tubo de centrífuga. Com uma pipeta de 10 mL adicionar 1 gota de octanol, adicionar 1 mL de HCL 3 mol/L e 20 mL de iso-octano. Agitar o tubo por 15 minutos depois centrifugar por 15 minutos a 3000 g para romper a emulsão. Retirar o sobrenadante que será

lido em espectrofotômetro a 275 nm. Utilizar iso-octano como branco. O resultado é obtido por meio da equação 1.

$$\text{Amargor (IBU)} = \text{Abs}_{275\text{nm}} \times 50 \quad (1)$$

onde: Abs_{275nm} é a absorbância da amostra no comprimento de onda de 275 nm.

4.4.6. Cor

Determinada segundo o método 9.6 da European Brewery Convention – EBC (2010), obtendo resultado em EBC. Com a cerveja em temperatura ambiente, coletar uma amostra de 100mL, realizar a descarbonatação por agitação e filtração em filtro N 12. A cor é lida em espectrofotômetro a 430 nm, sendo utilizada água destilada como branco e determinada pela equação 2.

$$\text{Cor (EBC)} = (\text{Abs}_{430\text{nm}} \times 12,7 \times d) \times 1,97, \text{ sendo } d = 1 \quad (2)$$

4.4.7. pH

Determinado segundo o método 9.3.5 da European Brewery Convention – EBC (2010), com descarbonatação prévia das amostras em temperatura de 20°C, pelo método potenciométrico.

4.4.8. Turbidez

Determinada segundo o método 9.2.9 da European Brewery Convention – EBC (2010), com descarbonatação prévia das amostras à temperatura de 20°C.

4.4.9. Compostos fenólicos totais

Determinados de acordo com o método espectrofotométrico Folin-Ciocalteu (Singleton; Rossi, 1965) com modificações realizadas por Zhao et al. (2010).

O método consiste em utilizar 0,5 mL de cerveja diluída onde são adicionados 2,5 mL de Folin-Ciocalteu diluído 10 vezes, reagir por cinco minutos, então adicionar 2 mL de carbonato de sódio a 7,5 % e completar com água deionizada até atingir o

volume de 10 mL. Após 1 hora de repouso em temperatura ambiente, realizar a leitura a 760 nm. A medição então é comparada com uma curva padrão de ácido gálico e o resultado expresso em mg de GAE por litro de cerveja (mg GAE L⁻¹).

4.4.10. Atividade antioxidante medida por DPPH

A atividade antioxidante por DPPH foi determinada de acordo com o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), que consiste em submeter 60 µL de uma amostra de cerveja a 1,75 mL de solução de DPPH 6x10⁻⁵ mol L⁻¹ (dissolvida em 50% de solução de metanol). A absorbância em 515 nm é medida após a solução permanecer em ambiente escuro e temperatura ambiente por 60 min. O cálculo da atividade antioxidante é feito pela fórmula 3. Prepara-se uma curva padrão com soluções de Trolox.

$$\text{Inibição(\%)} = (\text{Ab}-\text{As})/\text{Ab} \times 100 \quad (3)$$

onde Ab= absorbância controle (t=0min) e As= absorbância amostra (t=60min).

4.4.11. Atividade antioxidante medida por ABTS

O método ABTS utilizado foi descrito por Re et al. (1999) e modificado por Kuskoski et al. (2004). Para a realização da análise, necessita-se do radical ABTS, que é formado por uma reação química com persulfato de potássio em uma relação estequiométrica de 1:0,5. Uma vez formado, o radical ABTS é diluído em etanol até obter-se uma medida de absorbância de 0,70 (± 0,02) a um comprimento de onda de 754 nm e a uma temperatura de equilíbrio de 30 °C. Uma alíquota de 980 µL do radical diluído é transferida para cubeta e 20 µL da amostra de cerveja diluída é adicionada. A absorbância é lida nos tempos 1, 4 e 7 minutos após a adição da amostra. Prepara-se uma curva padrão com soluções de Trolox.

4.5. Análise sensorial

A análise sensorial foi efetuada em 3 sessões independentes, ou seja, em dias diferentes. Na primeira sessão foi entregue primeiramente o questionário da Figura 3, e em seguida foram analisadas as cervejas 1 até 6, no segundo dia as

cervejas 7 até 12 e a última sessão foi realizada com as cinco ultimas cervejas, ou seja, de 13 até 17. Para todas as cervejas foi entregue aos consumidores a ficha sensorial apresentada na Figura 4.

Figura 3 - Questionário inicial

Nome: _____ Idade: _____
Sexo: _____ Data: _____

Você gosta de cerveja? () Sim () Não Você já consumiu cerveja Pale Ale?
() Sim () Não

Com que frequência você consome
cerveja?

() Todos os dias
() Três vezes por semana
() Uma vez por semana
() Quinzenalmente
() Mensalmente

Figura 4 - Ficha da análise sensorial

Nome: _____ Idade: _____
Sexo: _____ Data: _____

Você está recebendo uma amostra de cerveja. Por favor, avalie a amostra quanto aos itens apresentados no quadro, utilizando a escala abaixo:

9 – gostei extremamente
8 – gostei muitíssimo
7 – gostei moderadamente
6 – gostei levemente
5 – nem gostei nem desgostei
4 – desgostei levemente
3 – desgostei moderadamente
2 – desgostei muitíssimo
1 – desgostei extremamente

AMOSTRA Nº: _____

Cor:	
Aroma:	
Sabor:	
Amargor:	
Aceitação global:	

Comentários:

A análise sensorial foi realizada quanto as características sensoriais cor, aroma, sabor, amargor e aspecto global. Também foi questionado antes da entrega das amostras se o consumidor já havia experimentado cerveja do tipo *pale ale*.

Seguindo a metodologia adaptada de Briggs et al. (2004), as amostras a 8°C, contendo 20 mL com espuma foram servidas em copos de 50 mL, cilíndricos, parede fina feitos de plástico. As cabines utilizadas foram individuais, mantidas

aproximadamente a 25°C, tendo boa iluminação, com luz branca e ausência de sombras.

Todos 75 consumidores, maiores de 18 anos, analisaram as 17 amostras. A aceitação foi avaliada através da escala hedônica estruturada de 9 pontos variando de 1 - desgostei extremamente a 9 - gostei extremamente, conforme Figura 3. As amostras foram codificadas aleatoriamente com números de três dígitos e entregues de forma monádica com ordem de apresentação randômica. As cervejas abertas foram mantidas sob refrigeração permanecendo em temperatura constante (2°C) durante toda a análise, a espuma foi controlada visualmente, sendo que assim que as cervejas perdiam o gás, elas eram descartadas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Escolha do lúpulo a ser utilizado na lupulagem a frio

Os sete lúpulos selecionados foram analisados em relação às suas atividades antioxidantes pelos métodos de DPPH e ABTS. Os resultados encontram-se na Tabela 3.

Em relação ao método de DPPH, os lúpulos *Saaz*, *Magnum* e *Herkules* mostraram neste estudo valores maiores do que os apresentados pela literatura (KROFTA et al., 2008; MIKYSKA; KROFTA, 2012). No trabalho de Krofta et al. (2008), o lúpulo *Saaz* (entre 70 - 80%) apresentou maiores valores de atividade antioxidante do que os lúpulo *Magnum* e *Herkules*, ambos entre 40 – 55%.

O lúpulo *Magnum* (ao nível de 5% de significância) também apresentou os menores valores de atividade antioxidante no trabalho de Mudura et al. (2010), comparado aos lúpulos *Brewers Gold*, *Hüller Bitterer* e *Perle*. Assim como ocorreu no estudo de Kowalczyk et al. (2013), no qual analisaram, por ABTS e outros testes de atividade antioxidante, extratos preparados do lúpulo *Magnum* e *Marynka* (lúpulo aromático). O lúpulo *Marynka* mostrou maior atividade do que o lúpulo *Magnum*.

Tabela 3 - Atividade antioxidante por DPPH e ABTS dos lúpulos selecionados*

Variedade**	DPPH (%)	Desvio Padrão	ABTS (%)	Desvio Padrão
Centennial ^r	87,86 ^{bc}	0,22	98,97 ^a	0,09
Magnum ^r	85,33 ^d	0,51	99,02 ^a	0,09
Herkules ^r	83,88 ^e	0,23	98,77 ^{ab}	0,15
Tradition ^a	89,50 ^a	0,42	98,56 ^{ab}	0,47
Saaz ^a	88,52 ^{ab}	0,08	98,71 ^{ab}	0,38
Cascade ^a	87,48 ^c	0,32	98,87 ^a	0,23
Fuggle ^a	84,03 ^e	0,53	98,10 ^b	0,17
Valor de p		0,000		0,013

*As médias seguidas pela mesma letra, onde “a” indica os maiores valores e “e” os menores valores, na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 %.

**As variedades marcadas com a letras “a” são aromáticas e com a letras “r” são de amargor.

Os lúpulos aromáticos no geral apresentaram maior atividade antioxidante, por DPPH, do que os lúpulos de amargor, pelo fato de possuírem maiores quantidades de polifenóis e compostos aromáticos do que os lúpulos de amargor, nos quais os α -ácidos estão mais presentes. O lúpulo *Tradition* apresentou a maior atividade antioxidante, juntamente com o *Saaz*, contudo em geral estes lúpulos são mais utilizados para cervejas do tipo *lager* e seus aromas costumam ser menos evidentes na cerveja, necessitando a utilização de maiores quantidades para que seu aroma torne-se mais perceptivo ao consumidor.

O lúpulo *Fuggle* embora tenha poder aromático maior que o *Tradition* e o *Saaz*, além de ser utilizado mais comumente em cervejas do tipo ale, sua utilização não é tão comum quanto os outros lúpulos aromáticos, além de ter apresentado atividade antioxidante inferior aos outros lúpulos por ambos os métodos.

De acordo com o relatório anual da produção de lúpulo nos EUA (USDA, 2016), o lúpulo *Cascade*, que apresenta aroma frutado, cítrico e floral, aparece entre as variedades com maior área plantada em todos os estados deste país, mostrando assim ser um dos preferidos pelos consumidores e pelos fabricantes de cerveja. Sua capacidade antioxidante tanto por DPPH como por ABTS foi próxima ou significativamente igual, ao nível de 5%, aos maiores valores encontrados dentre os lúpulos analisados. Portanto, por ser principalmente um lúpulo acessível a qualquer produtor e bem aceito entre os consumidores, além de apresentar uma atividade antioxidante maior do que alguns dos tipos de lúpulo analisados, foi escolhido, neste trabalho, o lúpulo *Cascade* para a realização da lupulagem a frio, seguindo o planejamento experimental proposto. Embora o lúpulo *Centennial* demonstre valores maiores dos que os do *Cascade* para a atividade antioxidante tanto pelo DPPH quanto pelo ABTS, sua produção e consumo ainda são inferiores, porém esboçam uma tendência de crescimento, sendo assim uma alternativa para os próximos trabalhos.

5.2. Análises físico-químicas

Para as análises físico-químicas de amargor, pH, teor alcoólico, fenólicos totais, cor (EBC), atividade antioxidante por DPPH e por ABTS, não foi possível ajustar um modelo para os valores encontrados, portanto foi realizada uma análise

de variância (ANOVA), seguida de um teste de Tukey para diferenciar as amostras (Tabela 4). As médias encontradas para turbidez também encontram-se na Tabela 4.

O amargor variou entre 21,48 e 32,10 IBU e o teor alcoólico entre 5,2 e 5,4%. Estes valores encontram-se em sua maioria dentro do padrão de uma American Amber Ale pelo guia da BJCP. Os valores da atividade antioxidante das 17 cervejas, tanto por DPPH como por ABTS, foram maiores do que os valores dos seus respectivos IC_{50} , 56,12 e 157,61 $\mu\text{mol TEL}^{-1}$, que correspondem a quantidade necessária de produto para alcançar o ponto médio da reação de inibição do reagente. Assim, as cervejas apresentaram uma alta atividade antioxidante por ambas as análises. Os valores de fenólicos totais variaram entre 79,95 e 90,91 mg Ác. GálicoL⁻¹. A cerveja 2 que maturou por quatro dias com a presença de 2,7 gL⁻¹ de lúpulo a 2°C foi a que apresentou maior teor de fenólicos totais (90,91 mg Ác. GálicoL⁻¹) com 5% de significância.

Das dezessete cervejas analisadas, cinco delas, 12, 13, 14, 15 e 17, apresentaram os maiores valores de amargor, sem diferença estatística entre si ao nível de 5%. Seus parâmetros estão no ponto central, 0, ou no ponto axial máximo, 1,68, para temperatura, tempo e concentração. Contudo as cervejas do ponto intermediário, 1, para os efeitos estudados, como por exemplo a cerveja 5 e 2, apresentaram valores significativamente (ao nível de 5%) menores em comparação com as cinco cervejas que apresentaram os maiores valores. Portanto, não foi possível evidenciar uma relação entre as diferentes maturações utilizadas e a variação do amargor em IBU entre as cervejas.

Assim como demonstram Forster e Gahr (2013), o pH não é afetado pela lupulagem a frio. Os valores encontrados estão de acordo com os encontrados por Forster e Gahr (2013), de 4,47 a 4,56, por Baiano e Terracone (2013), de 3,48 a 4,48 e por Granato et al. (2010), de 4,13 a 4,96.

Os compostos fenólicos na cerveja são oriundos principalmente do malte e do lúpulo. Eles são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da cerveja e pela formação da turbidez na cerveja ao se ligarem com as proteínas. Os valores encontrados estão abaixo dos obtidos tanto por Zhao et al. (2010), entre 152,01 e 339,12 mg Ác. GálicoL⁻¹, e também dos encontrados por Granato et al. (2010), 116,63 a 464,86 mg Ác. GálicoL⁻¹, embora em ambos os trabalhos as cervejas analisadas sejam na maioria do tipo *lager*, produzidas com menos malte escuro do que as cervejas do estilo *pale ale*. Os valores encontrados podem ser menores

devido à diferença no processamento, pois tanto Zhao et al. (2010) como Granato et al. (2010) analisaram cervejas comerciais, nas quais os polifenóis naturais da cerveja normalmente são retirados pelo processo de clarificação e posteriormente são adicionados antioxidantes exógenos para melhorar o sabor.

As duas cervejas com maior teor de fenólicos totais (2 e 1) foram maturadas a 2 °C, com tempo de contato de 4 dias, sendo a única diferença a concentração de lúpulo utilizada, que na cerveja 2 foi de 2,7 gL⁻¹, enquanto na 1 foi de 1,8 gL⁻¹. As outras cervejas maturadas a 2 °C (3 e 7) não se diferenciaram ao nível de 5% de significância, estando entre os mais baixos, contudo elas apresentam o mesmo tempo de contato do lúpulo com a cerveja, 16 dias e a concentração de lúpulo utilizada foi a mesma da cerveja 2 e 1. Portanto, pode ser que longos tempos de contato do lúpulo com a cerveja durante a maturação influenciem negativamente na concentração de compostos fenólicos totais do produto final, enquanto que baixas temperaturas durante a maturação possam ser favoráveis à produção de cervejas com maiores teores de compostos fenólicos.

Em relação a atividade antioxidante pelo método de DPPH, a variação entre as amostras foi baixa, sendo que 11 das 17 cervejas não apresentaram diferença significativa entre si, ao nível de 5%, como as cervejas com maior atividade antioxidante por este método.

A cor (EBC) mostrou uma variação entre as amostras embora isso não fosse esperado, pelo fato de tanto o lúpulo como o processo de lupulagem a frio não interferirem diretamente na coloração da cerveja. A turbidez da cerveja pode ter influenciado na análise, pois ambas são realizadas por análise de espectrofotometria. Contudo, essa diferença na cor (EBC) pode ser apenas analítica e pode não ser perceptiva visualmente, portanto não interferindo sensorialmente.

Tabela 4 - Análises físico-químicas das 17 cervejas*

Amostras (°C;dias;gL ⁻¹)	Amargor (IBU)	Desvio padrão	pH	Desvio padrão	Teor alcoólico (v/v)	Cor (EBC)	Desvio padrão	Turbidez	Desvio padrão	Fenólicos Totais (mg Ác. GálicoL ⁻¹)	Desvio padrão	DPPH** (μ mol TEL ⁻¹)	Desvio padrão	ABTS*** (μ mol TEL ⁻¹)
1 (2;4;1,8)	21,48 ^f	0,11	4,11 ^e	0,01	5,40	31,15 ^g	0,10	13,77	0,09	89,21 ^b	0,26	72,95 ^{abc}	1,59	299,49
2 (2;4;2,7)	23,88 ^{ef}	0,31	4,18 ^d	0,02	5,30	32,84 ^a	0,08	16,67	0,33	90,91 ^a	0,19	72,26 ^{abcde}	2,06	299,69
3 (2;16;2,7)	26,80 ^{cde}	1,48	4,22 ^c	0,01	5,40	30,7 ^h	0,05	12,08	0,12	82,83 ^h	0,16	75,12 ^a	1,47	299,49
4 (8;16;2,7)	25,95 ^{de}	0,56	4,19 ^{cd}	0,01	5,40	29,56 ^j	0,01	7,56	0,43	87,23 ^e	0,00	74,83 ^a	0,29	299,49
5 (8;16;1,8)	24,18 ^{ef}	0,17	4,17 ^d	0,01	5,30	28,19 ^k	0,05	5,03	0,03	79,95 ^j	0,00	74,90 ^a	1,11	299,69
6 (8;4;1,8)	26,15 ^{de}	1,91	4,19 ^{cd}	0,01	5,20	32,23 ^{cd}	0,03	15,87	0,56	87,91 ^d	0,16	73,42 ^{ab}	1,85	299,30
7 (2;16;1,8)	26,95 ^{cde}	0,35	4,20 ^{cd}	0,01	5,20	31,01 ^g	0,09	13,73	0,06	82,54 ^h	0,09	73,42 ^{ab}	0,48	299,49
8 (8;4;2,7)	28,33 ^{bcd}	0,53	4,21 ^{cd}	0,01	5,20	32,39 ^{bc}	0,01	17,57	0,27	86,10 ^f	0,19	72,60 ^{abcd}	1,67	299,30
9 (0;10;2,25)	25,98 ^{de}	1,31	4,22 ^c	0,01	5,20	31,68 ^f	0,03	16,59	0,10	88,76 ^c	0,00	73,02 ^{abc}	0,34	299,49
10 (5;0;2,25)	26,43 ^{de}	0,17	4,35 ^{ab}	0,01	5,20	32,08 ^{de}	0,08	15,12	0,11	88,65 ^c	0,09	73,39 ^{ab}	0,94	299,49
11 (5;10;1,5)	27,75 ^{bcd}	0,35	4,34 ^{ab}	0,01	5,20	32,50 ^b	0,02	17,96	0,92	88,76 ^c	0,16	67,28 ^f	2,09	299,30
12 (10;10;2,25)	28,70 ^{abcd}	0,28	4,38 ^a	0,01	5,40	31,94 ^e	0,02	14,03	0,73	87,29 ^e	0,09	69,10 ^{cdef}	0,79	299,30
13 (5;20;2,25)	31,25 ^{ab}	1,06	4,36 ^{ab}	0,00	5,30	30,18 ⁱ	0,01	9,85	0,15	87,06 ^e	0,16	69,05 ^{cdef}	1,65	299,30
14 (5;10;3)	32,10 ^a	0,99	4,37 ^a	0,01	5,20	32,22 ^{cd}	0,06	16,38	0,22	84,63 ^g	0,26	68,48 ^{def}	1,40	299,49
15 (5;10;2,25)	31,18 ^{ab}	1,23	4,37 ^{ab}	0,01	5,20	29,70 ^j	0,09	12,48	0,07	80,34 ^j	0,09	70,19 ^{bcd}	1,64	299,49
16 (5;10;2,25)	26,73 ^{cde}	0,39	4,36 ^{ab}	0,01	5,30	30,08 ⁱ	0,03	12,23	0,08	86,22 ^f	0,00	73,76 ^{ab}	0,98	298,92
17 (5;10;2,25)	30,03 ^{abc}	0,74	4,33 ^b	0,01	5,20	32,37 ^{bc}	0,09	17,52	0,25	81,87 ⁱ	0,09	68,14 ^{ef}	1,35	299,11
Valor de p	0,000		0,000			0,000				0,000		0,000		0,769

*As médias seguidas pela mesma letra, onde "a" indica os maiores valores e "k" os menores valores, na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5 %.

IC₅₀ = 56,12 μ mol TEL⁻¹*IC₅₀ = 157,61 μ mol TEL⁻¹

A partir dos dados obtidos pela análise de turbidez foi possível através de uma regressão linear ajustar os respectivos resultados a um modelo. A Tabela 5 apresenta a análise de variância (ANOVA) para o modelo encontrado a partir das médias da turbidez (Tabela 4) das 17 cervejas, eliminando os efeitos não significativos ao nível de 95% de confiança.

Tabela 5 - Análise de variância do modelo da turbidez

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	Valor de F	Valor de p
Modelo	119,28	2	59,639	8,30	0,003
x_2	86,39	1	86,392	12,94	0,003
x_1x_2	32,89	1	32,886	4,93	0,043
Erro	93,46	14	6,676		
Falta de ajuste	75,64	12	6,304	0,71	0,719
Erro puro	17,82	2	8,908		
Total	212,74	16			
R^2	0,5607				

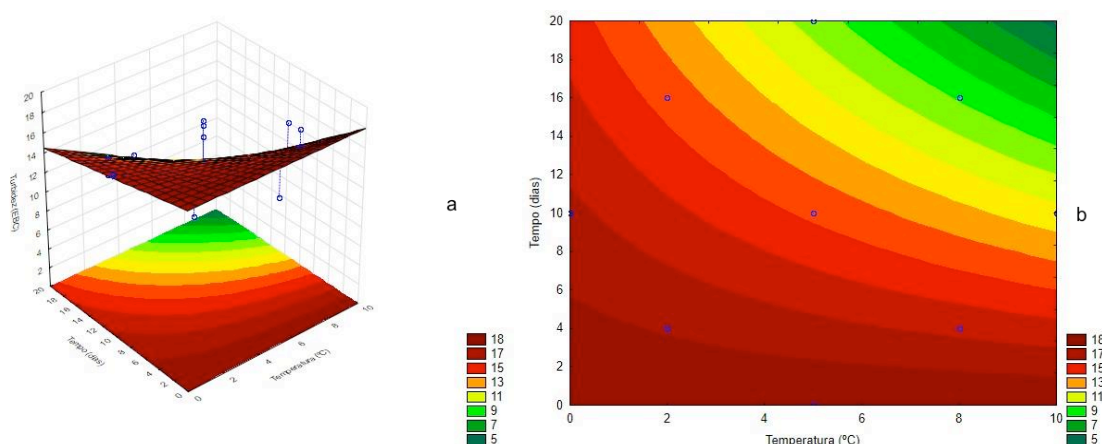
Onde: x_1 = Temperatura; x_2 = Tempo.

Após a verificação do modelo pela análise de variância foi elaborada a Equação 4, que mostra como os efeitos x_2 e x_1x_2 afetam a turbidez (y). A partir dela é possível notar que os maiores tempos de contato do lúpulo com a cerveja durante a maturação influenciam negativamente na turbidez da cervejas, assim como a interação entre a temperatura e o tempo.

$$y = 13,791 - 4,23 x_2 - 5,72 x_1x_2 \quad (4)$$

Para melhor elucidar o modelo, foram ajustadas a curva de contorno e a superfície de resposta (Figura 5). Em ambas nota-se que a temperatura tempo de contato entre o lúpulo e a cerveja é a principal variável responsável pela variação da turbidez. Conforme a cerveja passa mais tempo em contato com o lúpulo durante a maturação, maior é a influência da temperatura na turbidez.

Figura 5 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a turbidez das 17 cervejas em função do tempo e da temperatura



A turbidez na cerveja ocorre principalmente pela reação entre os polifenóis e as proteínas presentes na bebida. Ela é um fator relevante para cervejas comerciais, que passam por um processo de clarificação. Em relação a cervejas artesanais, que geralmente não passam por este processamento, a turbidez é um fator com pouca influência. Durante a presença do lúpulo na cerveja, ocorre a transferência de seus polifenóis para a bebida, aumentando sua concentração no líquido (Foster; Gahr, 2013).

Os menores valores de turbidez situam-se na faixa de maior temperatura e de maior tempo de contato. Isto pode proporcionar o término antecipado da transferência dos polifenóis do lúpulo para a cerveja, permitindo que a reação de turvação da bebida ocorra de forma mais rápida e por um tempo mais longo, formando produtos densos e assim mais suscetíveis a sedimentação às baixas temperaturas, que são utilizadas durante o armazenamento da cerveja pronta. Contudo, segundo a Figura 5, ao fazer a lupulagem a frio durante a maturação por até dois dias, a temperatura parece não influenciar na turbidez.

5.3. Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada com 75 consumidores. Dentre estes, 36 consumidores já consumiram cerveja do estilo *pale ale* e 41 eram mulheres. A maioria dos consumidores, ou seja, aproximadamente 55%, que realizaram a análise, bebem cerveja uma vez por semana.

5.3.1. Aroma

Os resultados da aceitação sensorial do aroma foram submetidos a uma análise de regressão. Após a elaboração do modelo, foi utilizado a análise de variância (ANOVA), Tabela 6, para analisar sua significância.

Tabela 6 - Análise de variância do modelo da aceitação sensorial do aroma

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	Valor de F	Valor de p
Modelo	0,11186	2	0,055932	6,78	0,009
x_1	0,07541	1	0,07541	9,14	0,009
x_1x_3	0,03645	1	0,03645	4,42	0,054
Erro	0,11555	14	0,008253		
Falta de ajuste	0,09108	12	0,007590	0,62	0,760
Erro puro	0,02447	2	0,012233		
Total	0,22741	16			
R^2	0,4919				

Onde: x_1 = Temperatura; x_3 = Concentração de lúpulo.

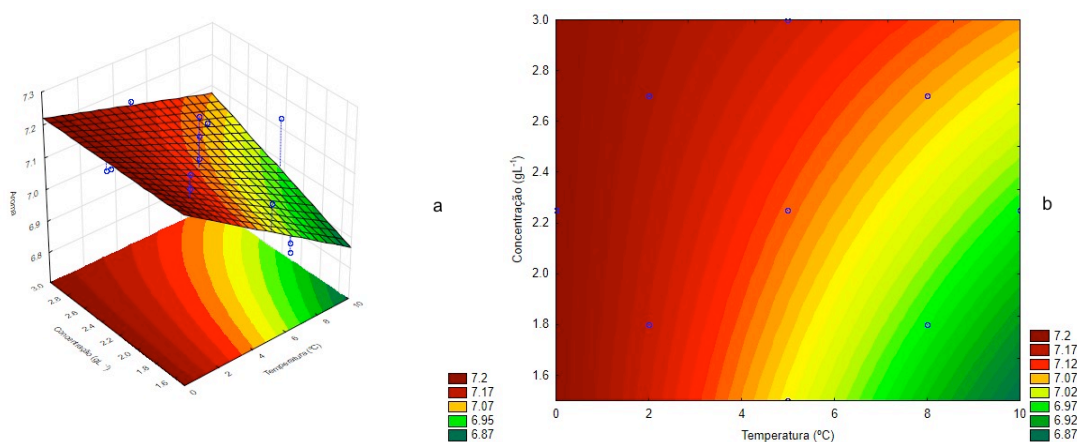
A interação (x_1x_3) da temperatura com a concentração de lúpulo utilizado para a lupulagem a frio ficou muito próxima de ter uma significância à 5%, contudo o modelo é significativo com 99% de confiança e com repetibilidade, pois o valor de p da falta de ajuste é de 0,76. O coeficiente de determinação (R^2) mostra que o modelo está muito próximo de representar a metade das variações dos resultados, por isso o modelo foi aceito.

A Equação 5 demonstra como as variáveis, ou seja, a temperatura de maturação e a sua interação com a concentração de lúpulo utilizada, afetam a aceitação sensorial do aroma da cerveja (y).

$$y = 7,0959 - 0,1249 x_1 + 0,1905 x_1x_3 \quad (5)$$

A aceitação sensorial do aroma das cervejas é influenciada negativamente pelo aumento da temperatura de maturação, contudo a interação entre a temperatura de maturação e a concentração de lúpulo utilizada na lupulagem a frio afeta positivamente a aceitação do aroma. A partir da Equação 5, foram ajustadas a superfície de resposta (a) e curva de contorno (b), presentes na Figura 6.

Figura 6 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a aceitação do aroma sensorial das 17 cervejas em função da concentração e da temperatura



Mitter e Cocuzza (2013) evidenciaram que as temperaturas 4 e 20°C não afetaram na concentração final do linalol - o principal composto aromático do lúpulo - na cerveja, ao adicionarem de 14,42 g de lúpulo por litro de cerveja durante a maturação por 14 dias. Todavia, a curva de contorno e a superfície de resposta do modelo elucidam uma maior aceitação sensorial do aroma pelas cervejas maturadas a temperaturas entre 0°C e 4°C do que as maturadas a temperaturas mais altas. Portanto, a concentração final do linalol na cerveja pode ter se diferido nas cervejas com *dry-hopping* em temperaturas abaixo de 4°C do que as com temperaturas acima deste valor e assim ter influenciado na aceitação sensorial do aroma. Contudo, seriam necessários mais estudos sobre a transferência dos compostos aromáticos do lúpulo durante a lupulagem a frio em diferentes temperaturas, para comprovar a sua influência na aceitação sensorial do aroma.

O efeito da concentração de lúpulo na aceitação sensorial do aroma pelos consumidores não ficou muito evidente tanto pela curva de contorno como pela superfície de resposta, pois os valores extremos da concentração de lúpulo estão na

mesma faixa de aceitação. Fora isso, as médias das notas ficaram próximas, variando entre 6,84 e 7,25 (Tabela 7), o que mostra uma pequena diferença nas médias e uma boa aceitação sensorial do aroma das cervejas pelos consumidores.

Tabela 7 - Média e desvio padrão das notas da aceitação sensorial do aroma

Aroma		
Amostras	Média	Desvio padrão
1	7,18	1,06
2	7,14	1,20
3	7,06	1,17
4	7,08	1,22
5	6,84	1,31
6	6,86	1,54
7	7,22	1,29
8	6,97	1,48
9	7,21	1,32
10	7,01	1,26
11	7,13	1,13
12	7,13	1,45
13	7,18	1,24
14	7,16	1,12
15	7,12	1,23
16	7,02	1,10
17	7,25	1,11

5.3.2. Amargor

Segundo Kappler et al. (2010 a), os iso- α -ácidos são responsáveis por mais de 85% do amargor da cerveja. Contudo, diferentemente da análise físico-química do amargor, a qual é determinada apenas pelos iso- α -ácidos da cerveja, a análise sensorial pode englobar muitos outros compostos oriundos principalmente do lúpulo, como os polifenóis, que interferem no gosto amargo da cerveja.

A Tabela 8 apresenta análise de variância do modelo encontrado a partir das médias das notas da aceitação sensorial do amargor, eliminando os efeitos principais e suas interações que não influenciaram significativamente ao nível de 5%.

Tabela 8 - Análise de variância do modelo da aceitação sensorial do amargor

Efeitos	Soma Quadrática	Grau de liberdade	Média Quadrática	Valor de F	Valor de p
Modelo	0,083688	2	0,041844	7,20	0,007
x_1^2	0,035638	1	0,035638	6,13	0,027
x_1x_2	0,048050	1	0,048050	8,26	0,012
Erro	0,081418	14	0,005816		
Falta de ajuste	0,079018	12	0,006585	5,49	0,164
Erro puro	0,002400	2	0,001200		
Total	0,165106	16			
R^2	0,5069				

Onde: x_1 = Temperatura; x_2 = Tempo.

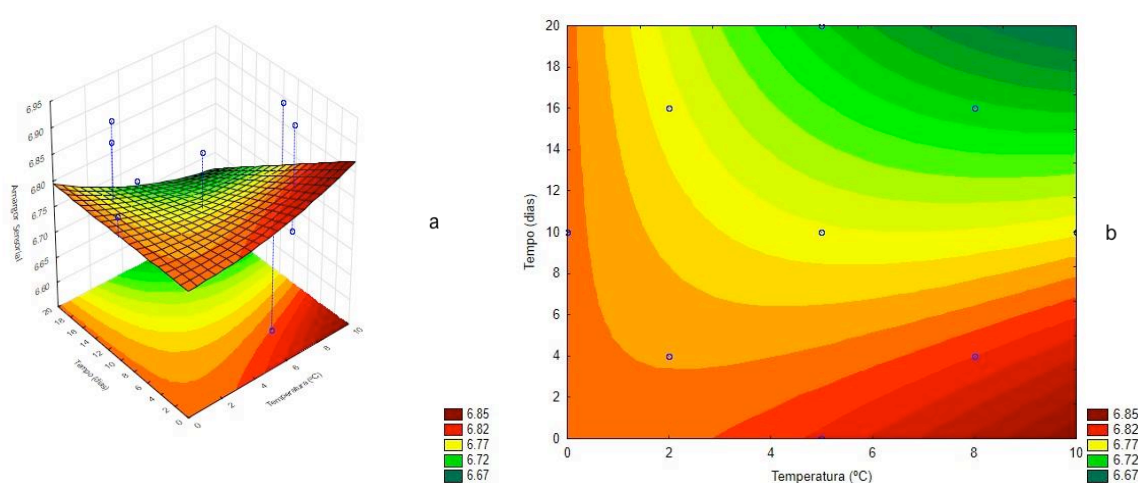
O coeficiente de determinação (R^2) do modelo é de 50,69%, ou seja, ele pode explicar pouco mais da metade da variação dos resultados. O modelo é significativo e possui repetibilidade, o valor de p para o modelo é menor do que 0,05 e da falta de ajuste é maior do que 0,05. Além disso, as variáveis x_1^2 e x_1x_2 também são significativas ao nível de confiança de 5%. Portanto, o modelo foi aceito para análise.

Em função dos coeficientes de regressão encontrados, foi possível elaborar a Equação 6 que demonstra as variáveis que afetam o amargor sensorial da cerveja (y), ou seja, a temperatura de maturação e a interação entre ela e o tempo de contato do lúpulo com a cerveja durante a maturação.

$$y = 6,7256 + 0,1479 x_1^2 - 0,2187 x_1x_2 \quad (6)$$

Na Figura 7 estão representadas a superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) ajustadas para evidenciar a tendência do modelo. Pela curva de contorno e pela superfície de resposta pode-se perceber que há uma maior aceitação sensorial do amargor para as cervejas produzidas com uma maturação em temperaturas próximas a 10°C e com o menor tempo de contato do lúpulo com a cerveja.

Figura 7 - Superfície de resposta (a) e curva de contorno (b) para a aceitação do amargor das 17 cervejas em função do tempo e da temperatura



Fora os iso- α -ácidos, os outros compostos que mais influenciam sensorialmente no amargor da cerveja são os polifenóis e os β -ácidos. Forster e Gahr (2013) encontraram uma taxa de transferência dos polifenóis totais para a cerveja de 50 a 60%, executando uma lupulagem a frio com duração de quatro semanas, à temperatura de 15°C na primeira semana e nas semanas restantes entre 0 e 1°C. A transferência dos polifenóis do lúpulo para a cerveja durante a lupulagem a frio pode ter contribuído para a aceitação sensorial do amargor, pois as cervejas 2 e 1, as quais obtiveram os maiores valores de fenólicos totais (Tabela 4), foram maturadas a 2 °C com tempo de contato de 4 dias, encontram-se em uma das faixas das cervejas com maior aceitação sensorial do amargor. Apesar disso, as médias das notas da aceitação do amargor encontram-se próximas e com desvio padrão similar (Tabela 9).

Tabela 9 - Média e desvio padrão das notas da aceitação sensorial do amargor

Amargor		
Amostras	Média	Desvio padrão
1	6,77	1,52
2	6,77	1,69
3	6,92	1,64
4	6,69	1,66
5	6,61	1,72
6	6,73	1,65
7	6,88	1,48
8	6,93	1,51
9	6,82	1,67
10	6,61	1,63
11	6,86	1,54
12	6,89	1,71
13	6,72	1,72
14	6,68	1,49
15	6,69	1,62
16	6,69	1,36
17	6,74	1,42

Portanto, houve pouca variação entre as notas mostrando que as variações encontradas pelo modelo tem pouca influencia na aceitação sensorial do amargor. Por outro lado, as médias das notas da aceitação do amargor variaram de 6,61 a 6,93, ou seja, mais próximas da nota 7, gostei moderadamente, mostrando que o amargor foi bem aceito pelos consumidores.

5.3.2. Cor, sabor e aceitação global

Em relação a aceitação global, da cor e do sabor não foi possível elaborar um modelo que se ajustasse aos dados através da regressão linear, portanto os dados presentes na Tabela 10 foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e não mostram diferença significativa ao nível de 5%.

Para a aceitação global e do sabor, as médias das notas variaram entre valores próximos a nota 7, gostei moderadamente, mostrando que as cervejas obtiveram uma boa aceitação entre os consumidores. As médias para a aceitação sensorial da cor pelo 75 consumidores ficaram entre a nota 7, gostei moderadamente, e a nota 8, gostei muitíssimo.

Tabela 10 - Média das notas da análise de aceitação global, da cor e do sabor

	Cor	Sabor	Aceitação Global
Amostras	Média	Média	Média
1	7,49	7,04	7,09
2	7,28	6,82	7,01
3	7,32	6,80	6,96
4	7,36	6,73	6,93
5	7,44	6,61	6,73
6	7,37	6,92	6,94
7	7,56	7,20	7,16
8	7,68	6,86	7,06
9	7,70	7,12	7,12
10	7,68	6,77	6,93
11	7,54	6,96	7,08
12	7,57	7,09	7,09
13	7,44	7,04	6,96
14	7,18	6,80	6,82
15	7,37	6,89	6,94
16	7,49	6,84	6,90
17	7,50	6,92	6,96
Valor de p	0,500	0,730	0,963

A estabilidade do sabor e aroma da cerveja pode ser melhorada pela presença de α -ácidos não isomerizados, os quais ainda tem um efeito positivo na espuma (Forster; Gahr, 2013). Em seu estudo, Mitter e Cocuzza (2013) encontraram tanto na cerveja maturada a 20°C como na maturada a 4°C um aumento na concentração de α -ácidos durante a lupulagem a frio. Portanto, mesmo havendo um

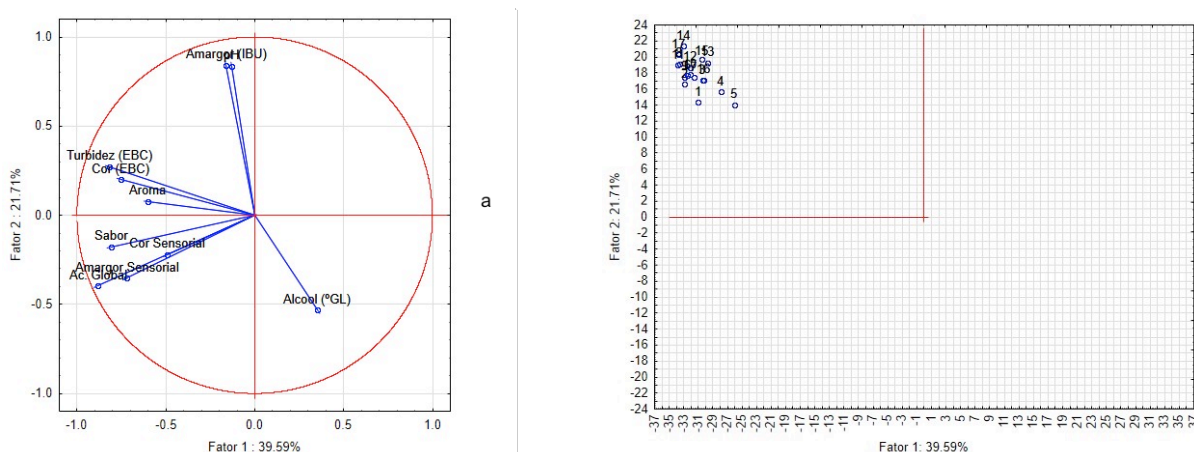
aumento na concentração de α -ácidos na cerveja e uma possível melhora na estabilidade do sabor e do aroma das cervejas, esta melhora não alterou significativamente a aceitação global e do sabor.

Embora a análise físico-química da cor (EBC) tenha demonstrado uma variação entre os resultados, esta variação não influenciou na aceitação sensorial da cor pelos consumidores. Existem duas possibilidades, ou a variação da cor da cerveja (clara ou escura) não afeta a aceitação sensorial da cor da bebida ou a variação dos valores da cor (EBC) encontrados não foi grande o suficiente ao ponto de influenciar na aceitação sensorial da cor do produto.

5.3.3. Análise de componentes principais

A análise de componentes principais (Figura 8) mostrou que o fator 1 explica 39,59% da variação dos dados e o fator 2 explica 21,71%, assim totalizando 61,30% do total de variação dos dados. A explicação é baixa para cada componente.

Figura 8 - Análise de componentes principais



O fator 1 foi explicado por um único grupo composto pelas variáveis: turbidez, cor (EBC), sabor, amargor sensorial, aceitação global (Figura 8 a). O fator 2 foi explicado pelo amargor (IBU) e o pelo pH. As variáveis no mesmo grupo foram correlacionadas positivamente para cada componente.

A Figura 8 b mostra que as cervejas ficaram agrupadas na mesma região, afastada negativamente do eixo central para o Fator 1 e positivamente para o Fator 2, portanto são similares. Fora isso, pode-se notar que todas as amostras podem ser

caracterizadas em relação ao Fator 1 pelos atributos turbidez (EBC), cor (EBC) enquanto que, para o Fator 2, pelos atributos pH e amargor (IBU). Além disso, é possível identificar que as amostras não apresentaram diferença entre si, pelo fato de estarem agrupadas muito próximas umas das outras.

6. CONCLUSÃO

Entre os lúpulos analisados, os considerados aromáticos foram os que apresentaram maiores teores de atividade antioxidante pelo método de DPPH. Portanto, estes seriam os mais indicados para a utilização no processo de lupulagem a frio, visando um produto com uma concentração maior de compostos bioativos.

Através das análises de amargor em IBU, pH, teor alcoólico, teor fenólicos totais, cor (EBC) e atividade antioxidante por DPPH e por ABTS das 17 cervejas, não foi possível identificar um modelo que os relacionassem à temperatura de maturação, ao tempo de contato entre o lúpulo e a cerveja durante a lupulagem a frio ou a concentração de lúpulo adicionado, na faixa de valores propostos pelo planejamento experimental. Apenas para a concentração de fenólicos totais que foi possível notar, pela comparação das médias, que temperaturas de maturação próximas a 2°C e curto tempo de contato entre o lúpulo e a cerveja, até 4 dias, foram favoráveis à produção das cervejas com maiores resultados nesta análise.

O modelo elaborado pelos valores encontrados para turbidez evidenciou uma influência do tempo de contato do lúpulo com a cerveja. Segundo o modelo, independentemente da temperatura utilizada na maturação, as cervejas em contato com o lúpulo por até dois dias durante a lupulagem a frio tiveram os maiores valores de turbidez, enquanto que as bebidas com menor turbidez são alcançadas por um tempo de contato prolongado (em torno de 20 dias) e temperaturas próximas a 10°C.

Embora haja a transferência de compostos como o linalol, que fornece aroma, os polifenóis, relacionados ao amargor, e os α -ácidos, que influenciam no sabor e aceitação global, durante a lupulagem a frio, não foi possível evidenciar uma alteração significativa na aceitação sensorial destas características. A variação das médias foi baixa para todas as características analisadas. Além disso, a análise de componentes principais deixa evidente a pouca diferenciação entre as cervejas, pois todas ficaram muito próximas, no mesmo quadrante. Por outro lado, as médias das notas para todas as características sensoriais – cor, aroma, sabor, amargor e aceitação global - foram próximas de 7, gostei moderadamente.

Portanto, temperaturas de 0 a 10°C, tempo de contato de 0 a 20 dias e adição de lúpulo de 1,5 a 3 gL⁻¹ durante a lupulagem a frio na maturação não influenciam nas características físico-químicas e na aceitação sensorial da cerveja. Assim, é possível que cada produtor escolha um método que se encaixe melhor com sua

realidade, sem alteração no produto final.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SUPERMERCADOS (ABRAS). Cerveja artesanal vira negócio lucrativo. Disponível em: <<http://www.abras.com.br/clipping.php?area=10&clipping=18615>>. Acesso em: 07 nov. 2016.

ALMAGUER, C.; SCHÖNBERGER, C.; GASTL, M.; ARENDT, E. K.; BECKER, T. Humulus lupulus – a story that begs to be told. **Journal of the Institute of Brewing**. vol. 120, p. 289–314. 2014.

ARON, P.; SHELLHAMMER, T. A Discussion of Polyphenols in Beer Physical and Flavour Stability. **Journal of the Institute of Brewing**. vol.116, n. 4, p. 369–380, 2010.

ASCHER, B. Global Beer: The Road To Monopoly. **American Antitrust Institute**, 2012. Disponível em: <http://www.antitrustinstitute.org/sites/default/files/Global%20Beer%20Road%20to%20Monopoly_0.pdf> Acesso em: 05 de junho de 2015.

BAIANO, A.; TERRACONE, C. Physico-Chemical Indices, Iso-a-Acid, Phenolic Contents and Antioxidant Activity of Commercial Beers. **Journal of Food Research**. vol. 2, p. 107-120, 2013.

BAMFORTH, C. The foaming properties of beer. **Journal of the Institute of Brewing**. vol. 91, p. 370-383, 1985.

BAMFORTH, C. Perceptions of Beer Foam. **Journal of the Institute of Brewing**. vol.106, n. 4, p. 229-238, 2000.

BAXTER, E.; HUGHES, P. Beer: Quality, safety and nutritional aspects. Cambridge, U.K: **Royal Society of Chemistry**. 2001.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, vol.28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Decreto n. 6871, de 04 de junho de 2009. Regulamenta a Lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e fiscalização de bebidas. **Diário Oficial da União. Brasília, DF, 05 jun. 2009.**

BEER JUDGE CERTIFICATION PROGRAM (BJCP). **Beer style guidelines**. 2015. Disponível em: <http://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf> Acesso em: 29 jan. 2017.

BENITEZ, J. L.; FORSTER A.; DE KEUKELEIRE, D.; MOIR, M.; SHARPE, F. R.; VERHAGEN, L. C.; WESTEWOOD, K. T. EBC Manual of Good Practice: Hops and Hop Products. **Getränke-Fachverlag Hans Carl**, Nürnberg, Germany. 1997.

BIENDL, M. Hops and health, **Technical Quarterly Master Brewers Association of the Americas** vol. 46, p. 1–7, 2009.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. Brewing: Science and practice. **1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing Limited**, vol. 1, 2004.

CESLOVÁ, L.; HOLCAPEK, M.; FIDLER, M.; DRSTICKOVÁ, J.; LÍSA, M. Characterization of prenylflavonoids and hop bitter acids in various classes of Czech beers and hop extracts using high-performance liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. vol.1216, p.7249–7257., 2009.

COGHE, S.; D'HOLLANDER, H.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. “Impact of Dark Specialty Malts on Extract Composition and Wort Fermentation”. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 111, n. 1, p. 51-60. 2005.

COGHE, S.; MARTENS, E.; D'HOLLANDER, H.; DIRINCK, P. J.; DELVAUX, F.

“Sensory and Instrumental Flavour Analysis of Wort Brewed with Dark Specialty Malts”. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 110, n. 2, p. 94-103. 2004.

DE COOMAN L.; AERTS, G.; OVERMEIRE H. Alterations of the profiles of iso- α -acids during beer ageing, marked instability of trans-iso- α -acids and implications for beer bitterness consistency in relation to tetrahydroiso- α -acids. **Journal of the Institute of Brewing**, vol.106, n. 3, p.169-178, 2000.

DE KEUKELEIRE, D.; VINDEVOGEL, J.; SZUCS, R.; SANDRA, P. The history and analytical chemistry of beer bitter acids. **Trends in Analytical Chemistry**, vol. 77, n. 8, p. 275-280, 1992.

DONADINI, G.; FUMI, M.D.; KORDIALIK-BOGACKA, E.; MAGGI, L.; LAMBRI, M.; SCKOKAI, P. “Consumer interest in specialty beers in three European markets”. **Food Research International**. vol. 85, p. 301–314, 2016.

DRESEL, M.; PRAET, T.; VAN OPSTAELE, F.; VAN HOLLE, A.; NAUDTS, D.; DE KEUKELEIRE, D.; DE COOMAN, L.; AERTS, G. Comparison of the Analytical Profiles of Volatiles in Single-Hopped Worts and Beers as a Function of the Hop Variety. **Brewing Science**, vol. 68, p. 8-28, 2015.

EßLINGER, H. M. Handbook of Brewing - Processes, Technology, Markets. **Weinheim, ed. Wiley-VCH GmbH & Co.** 2009.

EßLINGER, H. M.; NARZIß, L. Beer. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**. 2009.

EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica-EBC**. Section 9 Beer Method 9.2.3, 9.3.5, 9.4, 9.6, 9.8, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, 2010.

FLY, W.; CHICOYE, E. The Effect of Countercurrent Distribution Fractions of Hop Extracts on Beer Foam. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, vol. 35, p. 69-72, 1976.

FORSTER, A. Polyphenols in Saaz Hops. **Chmelarstvi Internationale Ausgabe**, p. 45 – 51, 1999.

FORSTER, A.; BECK, B.; SCHMIDT, R. Hop Polyphenols - do more than just cause turbidity in beer. **Hopfenrundschau International**, p. 68 – 74, 1999.

FORSTER, A.; BECK, B.; SCHMIDT, R.; JANSEN, C.; MELLENTHIN, A. On the composition of low molecular polyphenols in different varieties of hops and from two growing areas. **Brauwissenschaft**. vol. 55, p. 98–108, 2002.

FORSTER, A.; GAHR, A. On the fate of certain hop substances during dry-hopping, **BrewingScience – Monatsschrift für Brauwissenschaft**, vol. 66, p. 93-103, 2013.

GRANATO, D.; BRANCO, G.; FARIA, J.; CRUZ, A. Characterization of Brazilian lager and brown ale beers based on color, phenolic compounds, and antioxidant activity using chemometrics. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. vol. 91, p. 563 – 571, 2010.

HALEY, J.; PEPPARD, T. Differences in utilisation of the essential oil of hops during the production of dry-hopped and late-hopped beers. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 89, p. 87-91, 1983.

HELMJA, K.; VAHER, M.; PÜSSA, T.; KAMSOL, K.; ORAV, A.; KALJURAND, M. Bioactive components of the hop strobilus: comparison of different extraction methods by capillary electrophoretic and chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**. vol. 1155, n. 2, p. 222 - 229, 2007.

HEYERICK, A.; VERVARCKE, S.; DEPYPERE, H.; BRACKE, M.; DE KEUKELEIRE, D. Photolysis of hop-derived trans-iso-alpha-acids and trans-tetrahydroiso-alpha-acids: product identification in relation to the lightstruck flavour of beer. **Photochemical & Photobiological Sciences**, vol. 2, p. 306-314, 2003

HUANG, Y.; TIPPMANN, J.; BECKER, T. Kinetic Modeling of Hop Acids during Wort Boiling International **Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, vol. 3, n. 1. 2013.

KAPPLER, S.; KRAHL, M.; GEISSINGER, C.; BECKER, T.; KROTTENTHALER, M. Degradation of Iso- α -Acids During Wort Boiling. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 116, n. 4, 2010 (a).

KAPPLER, S.; SCHÖNBERGER, C.; KROTTENTHALER, M.; BECKER, M. Isohumulones a review. **Brewing Science**. vol. 63, p. 105-111, 2010 (b).

KARABÍN, M.; HUDCOVÁ, T.; JELÍNEK, L.; DOSTÁLEK, P. Biotransformations and biological activities of hop flavonoids. **Biotechnology Advances**, 2015.

KAVALIER, A. R.; MA, C.; FIGUEROA, M.; KINCAID, D.; MATTHEWS, P. D.; KENNELLY, E. J. Targeted analysis of polyphenol metabolism during development of hop (*Humulus lupulus* L.) cones following treatment with prohexadione-calcium **Food Chemistry**. Vol. 145, p. 254–263, 2014.

KIRIN BEER UNIVERSITY REPORT. Global beer consumption by country in 2013. 2014. Disponível em: http://www.kirinholdings.co.jp/english/news/2014/0108_01.html#Table1. Acesso em: 5 de jul. de 2016.

KOWALCZYK, D.; ŚWIECA, M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**. vol. 119, p. 103–110, 2013.

KROFTA, K.; MIKYŠKA, A.; HAŠKOVÁ, D. Antioxidant Characteristics of Hops and Hop Products. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 114, n. 2, p. 160–166, 2008.

KUNZ, T.; FRENZEL, J.; WIETSTOCK, P. C.; METHNER, F-J. Possibilities to improve the antioxidative capacity of beer by optimized hopping regimes **Journal of the Institute of Brewing**. vol. 120, p. 415–425, 2014.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; GARCÍA-PARILLA, M. C.; TRONCOSO, A. M.; FETT, R. Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. **Rev. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol.Alim.**, vol. 24, n. 4, p. 691-693, 2004.

LERMUSIEAU, G.; LIEGEOIS C.; COLLIN S. Reducing power of hop cultivars and beer ageing. **Food Chemistry**, vol.72, p.413-418, 2001.

MAGALHÃES, P.; VIEIRA, J. S.; GONÇALVES, L. M.; PACHECO, J. G.; GUIDO, L. F.; BARROS, A. A. Isolation of phenolic compounds from hop extracts using polyvinylpolypyrrolidone: Characterization by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. vol. 1217, p. 3258–3268, 2010.

MIKYŠKA, A.; KROFTA, K. Assessment of changes in hop resins and polyphenols during long-term storage. **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 118, p. 269–279, 2012.

MITTER, W.; COCUZZA S. Wiederbelebtes Verfahren. Die Kalthopfung – Grundsätzliches und Techniken. **Brauindustrie**, vol. 4, p.10-12, 2012.

MITTER, W.; COCUZZA S. Dry-hopping – A study of various parameters. **Brewing and Beverage Industry International**, vol. 4, p.70-74, 2013.

MUDURA, E.; MUSTE, S.; TOFANA, M.; SOCACI, S. A.; GOINA, V. Improving the hop utilization in the beer biotechnology, **Bulletin of university of agricultural sciences and veterinary medicine, Agriculture** vol. 65, n. 2, p. 281-286, 2008.

MUDURA, E.; TOFANĂ, M.; PĂUCEAN, A.; SOCACI, S. A. The evaluation of antioxidant capacity of Romanian hops. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, vol. 16, n. 2, p. 262-264, 2010.

NARZIß, L. "Abriss der Bierbrauerei". **Weinheim, 7 ed. Wiley-VCH GmbH & Co.** 2013.

PIENDL, A.; BIENDL, M. Physiological significance of polyphenols and hop bitters in beer. **Brauwelt International**, vol. 18, n. 4, p. 310 - 317, 2000.

PREEDY, V. R. Beer in Health and Disease Prevention. **Amsterdam: Elsevier/Academic Press**, 2009.

RE, R. PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Rad. Biol. Med.**, vol. 26, p. 1231-1237, 1999.

ROBERTS, T.; WILSON, R. Hops, in **Handbook of Brewing**, 2nd ed. (Priest, F. J., and Stewart, G. G., Ed.) Taylor & Francis. p. 177–280, 2006.

SCHÖNBERGER, C. Hopfenstopfen – gut gestopft ist halb gewonnen. **Brauwelt**, vol. 9-10, p. 251-254, 2012.

SCHÖNBERGER, C.; WIESEN, E. Die Kunst der Kalthopfung. **Der Doemensianer**. vol. 1, p. 42-43, 2013.

SHIMWELL, J. On the relationship between the staining properties of bacteria and their reaction towards hop antiseptic – Part III, **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 43, p. 191–195, 1937.

SHOKRIBOUSJEIN, Z.; GALAN, D. R.; MICHIELS, C.; GEBRUERS, K.; VERACHTERT, H.; MARTENS, J.; PEETERS, C.; DERDELINCKX, G. Effect of a magnetic field on dispersion of a hop extract and the influence on gushing of beer **Journal of Food Engineering**. vol. 145, p. 10 –18, 2015.

SINGLETON, V. L.; ROSSI J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic - phosphotungstic acid reagent. **American Journal of Enology and Viticulture**. Vol. 16, p. 144 – 158, 1965.

TAGASHIRA, M.; UCHIYAMA, K.; YOSHIMURA, T.; SHIROTA, M.; UEMITSU, N. Inhibition by hop bract polyphenols of cellular adherence and water-insoluble glucan

synthesis of mutans streptococci. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** vol. 61, p. 332–335, 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). NATIONAL HOP REPORT. Dezembro 2016. Disponível em: https://www.usahops.org/img/blog_pdf/75.pdf. Acesso em: 28 de janeiro de 2017.

VERZELE, M. Centenary Review – 100 Years of hop chemistry and its relevance to brewing, **Journal of the Institute of Brewing**, vol. 92, p. 32–48, 1986.

WANG, X.; YANG, L.; YANG, X.; TIAN, Y. In vitro and in vivo antioxidant and antimutagenic activities of polyphenols extracted from hops (*Humulus lupulus* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*. vol. 94, p. 1693–1700, 2014.

WUNDERLICH, S.; BACK, W. “Overview of manufacturing beer: Ingredients, processes, and quality criteria”. In V. R. Preedy (Ed.), **Beer in health and disease prevention**. Burlington: Academic Press. 1st ed., p. 3–16, 2009.

ZHAO H.; CHENA, W.; LUB, J.; ZHAO, M. Phenolic profiles and antioxidant activities of commercial beers. **Food Chemistry**, vol. 119, p. 1150 – 1158, 2010.

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE
(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 466/2012)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “Otimização do processo de dry-hopping durante a maturação de cervejas artesanais” sob responsabilidade do pesquisador João Olavo Figueiredo Quelhas. O estudo será realizado por meio de análises sensoriais de quinze cervejas (utilizando diferentes concentrações de lúpulo), em 3 sessões distintas para avaliação da aceitabilidade dos mesmos. A pesquisa oferecerá riscos físicos mínimos a saúde, pois os produtos experimentados são de consumo comum, além de serem manipulados utilizando-se as Boas Práticas de Manipulação/Fabricação. Serão excluídos da pesquisa durante o recrutamento indivíduos com idade inferior a 18 anos, hipertensão arterial, diabetes, doença celíaca, intolerância à lactose, intolerância a qualquer um dos componentes da formulação, e/ou mais algum problema detectado nessa fase inicial. Além disso, ressalta-se que a quantidade de cerveja consumida neste estudo é inferior a quantidade considerada de consumo moderado. Você poderá consultar o pesquisador responsável em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos serão mantidos em sigilo, e estes últimos apenas serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre eventuais resultados decorrentes da pesquisa. No caso de eventual problema de saúde (efeito adverso) decorrente de sua participação nos testes sensoriais, você será encaminhado à Seção Técnica de Saúde (UNAMOS), situado à Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jardim Nazareth – São José do Rio Preto/SP – Telefones (17) 3221.2415 – 3221.2416 – 3221.2485.

Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, por favor, informe seus dados abaixo, coloque sua assinatura a seguir e rubrique cada página deste termo.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____ Fone: _____

E-mail: _____

São José do Rio Preto, _____ de _____ de 2016.

Usuário ou responsável legal

Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador.

Nome: João Olavo Figueiredo Quelhas	Cargo/Função: Mestrando
Instituição: Departamento de Engenharia e Tecnologia de Alimentos/IBILCE/UNESP	
Endereço: Rua Cristóvão Colombo, 2265 – Jd. Nazareth – São José do Rio Preto/SP – Telefone: (17) 3221 2557	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do IBILCE/UNESP. São José do Rio Preto – Fone: (17) 3221 2545/ 3221 2384	