

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DO *TRANS*-2-NONENAL NA QUALIDADE
SENSORIAL DA CERVEJA**

Claudia Sachett Mattanna

Porto Alegre
2010/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DO *TRANS*-2-NONENAL NA QUALIDADE
SENSORIAL DA CERVEJA**

Claudia Sachett Mattanna

Monografia apresentada ao Curso
de Engenharia de Alimentos para
obtenção do título de Engenheira de
Alimentos

Orientadora: Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre

2010/2

**EFEITO DO *TRANS*-2-NONENAL NA QUALIDADE
SENSORIAL DA CERVEJA**

Claudia Sachett Mattanna

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA

.....
Simone Hickmann Flôres (Orientadora)
Doutora em Engenharia dos Alimentos
ICTA - UFRGS

.....
Alessandro de Oliveira Rios
Doutor em Ciência de Alimentos
ICTA - UFRGS

.....
Plinho Francisco Hertz
Doutor em Ciência dos Alimentos
ICTA - UFRGS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Claudio e Virginia, que sempre colocaram a cima de tudo meus estudos, me deram as melhores condições possíveis para que eu pudesse chegar aonde cheguei. E o mais importante é que durante todo esse tempo nunca me faltou apoio, carinho e amor para que eu seguisse em frente.

Também dedico ao meu irmão, Diego, que me fez companhia no apartamento de Porto Alegre durante esses cinco anos de graduação. Nossas brigas, conversas e desabafos foram imprescindíveis para o nosso amadurecimento e para que seguíssemos nossa trajetória de estudos.

Ao meu noivo, Matias, dedico esse trabalho, pois acompanhou toda minha trajetória da graduação, sempre me dando dicas de estudo, estágios e empregos e me acalmando nas horas difíceis, sempre com muito amor e carinho, tornando meus dias mais fáceis, alegres e felizes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha professora orientadora, Simone Hickmann Flôres, pela orientação na realização deste trabalho.

O meu muito obrigado vai também para o professor Alessandro de Oliveira Rios, que não mediu esforços para me ajudar na realização das análises de HPLC, deixando seus momentos de lazer inclusive em domingos para me tirar de sufocos!

Roberval Bittencourt de Souza, obrigada por disponibilizar os equipamentos de seu laboratório no ICTA para que eu pudesse preparar minhas amostras.

Agradeço à minha colega, Paula Wendelstein Cano, pela agradável companhia no distante e isolado laboratório de HPLC.

RESUMO

A mudança do perfil sensorial da cerveja ao longo do envelhecimento tem sido apontada como um dos maiores problemas de qualidade nessa bebida. Um dos *off-flavours* bastante conhecido é o associado ao “papelão” ou “cerveja oxidada”. Esse *off-flavour* tem sido associado ao composto *trans*-2-nonenal, um acetaldeído. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os fatores que levam a formação desse composto, analisar através de HPLC a quantidade de *trans*-2-nonenal presente em diferentes amostras de cerveja e posteriormente realizar análise sensorial de duas amostras com diferentes níveis de *trans*-2-nonenal, com o intuito de verificar a influência da presença desse composto na qualidade sensorial da cerveja. Foi observado que o nível desse composto aumenta com o envelhecimento da cerveja e que o sabor de cerveja oxidada, ou *off-flavour* de “papelão”, está diretamente ligado ao nível de *trans*-2-nonenal presente na bebida.

ABSTRACT

The change in the sensory profile of the beer throughout the aging process has been identified as a major quality problem in this beverage. One of the off-flavors well known is the one whose is associated with the "cardboard" or "oxidized beer." This off-flavor has been linked to the compound *trans*-2-nonenal, an acetaldehyde. The objective of this research was to evaluate the factors that lead to the formation of this compound, to analyze by HPLC the amount of *trans*-2-nonenal present in different samples of beer and then perform a sensory analysis of two samples with different levels of *trans*-2-nonenal in order to verify the influence of the presence of this compound on sensory quality of beer. It was observed that the level of this compound increases with the aging of the beer and that the oxidized flavor of beer, or "cardboard" off-flavor, is directly linked to the level of *trans*-2-nonenal in this beverage.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Objetivos.....	8
1.1.1 <i>Objetivos Gerais.....</i>	8
1.1.2 <i>Objetivos Específicos.....</i>	8
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1. Matérias-primas utilizadas na cerveja.....	10
2.2. Processamento da cerveja.....	11
2.3. Qualidade sensorial da cerveja.....	16
3. ARTIGO.....	23
1. Introdução.....	24
2. Materiais e Métodos.....	26
2.1. <i>Instrumentação.....</i>	27
2.2. <i>Reagentes químicos.....</i>	28
2.3. <i>Amostras.....</i>	28
2.4. <i>Quantificação do trans-2-nonenal.....</i>	28
2.5. <i>Análise sensorial.....</i>	29
3. Discussão dos Resultados.....	31
3.1. <i>Quantificação do trans-2-nonenal nas amostras de cerveja.....</i>	31
3.2. <i>Análise sensorial.....</i>	32
4. Conclusão.....	33
Referências Bibliográficas.....	33
4. CONCLUSÃO GERAL.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1. INTRODUÇÃO

Tanto para a cerveja como para qualquer outro produto alimentício, alguns aspectos de qualidade mudam durante a estocagem. Há algum tempo atrás o que determinava a vida de prateleira da cerveja era a avaliação microbiológica, que atualmente está sob controle. Hoje, a atenção está mais voltada para os efeitos das mudanças sensoriais da cerveja, principalmente no que diz respeito a aromas (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Apesar de muitos anos de estudo, ainda não há um consenso entre os estudiosos sobre a origem dos compostos que causam os *off-flavours* na cerveja, principalmente o de “papelão” (BAMFORTH, 2003).

As reações de oxidação parecem ser o principal mecanismo de deterioração da cerveja. A temperatura acelera as reações de oxidação, envelhecendo a bebida mais rapidamente (OETTERER, REGITANO-D'ARCE E SPOTO, 2006).

A oxidação de ácidos graxos a aldeídos está associada com o *off-flavour* de “papelão”. O principal composto que se forma com a oxidação e que transfere à cerveja o *off-flavour* de “papelão” é o *trans-2-nonenal* (IBD, 2008). O *trans-2-nonenal* é um acetaldeído que, segundo Santos (2002), é determinante na qualidade organoléptica de uma cerveja.

Saison et al. (2009) determinaram o *threshold* do *trans-2-nonenal* em cerveja, e encontraram um valor de 0,03 ppb. Esse valor extremamente baixo demonstra a importância desse composto no envelhecimento da cerveja, pois pequenas concentrações já poderão ser percebidas.

É de grande importância para a indústria cervejeira o mapeamento desses defeitos para que possa melhorar cada vez mais a qualidade da cerveja, podendo obter um produto com características de frescor por mais tempo.

1.1. Objetivos

1.1.1. Objetivos Gerais

Avaliar fatores que causam *off-flavour* de “papelão” em cerveja tipo Pilsen.

1.1.2. Objetivos Específicos

Análise por HPLC da quantidade de *trans-2-nonenal* presente em diferentes amostras de cerveja.

Análise sensorial de duas amostras com diferentes níveis de *trans*-2-nonenal com o intuito de verificar a influência da presença desse composto na qualidade sensorial da cerveja.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Matérias-primas utilizadas na cerveja

A qualidade de um produto alimentício está ligada à qualidade da matéria-prima utilizada. As matérias-primas necessárias para a fabricação de cerveja são malte de cevada, adjuntos, lúpulo e água (OETTERER, REGITANO-D'ARCE e SPOTO, 2006).

O malte é um produto da germinação controlada das sementes de cevada. A finalidade da maltagem é aumentar a quantidade de enzimas do grão, as quais irão catalisar as reações de quebra das macromoléculas (como proteínas, amidos e glicanos), presentes nas matérias-primas, em compostos menores, solúveis no mosto (VENTURINI FILHO, 2000).

Os adjuntos, como milho, arroz, trigo e xaropes, fornecem carboidratos ao mosto, podendo assim ser reduzida a quantidade de malte na composição da cerveja, além de economia de malte, fornece características de leveza e cor menos intensa. Alguns adjuntos como griz de milho e arroz devem passar por um processo de geleificação do amido antes de ser adicionado ao mosto. Xaropes obtidos da hidrólise do amido desses cereais podem ser adicionados diretamente no mosto por não precisarem mais da ação de enzimas (LEWIS e BAMFORTH, 2006).

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta pertencente à família *Cannabaceae*. As suas flores e frutos contêm lupulina, que são basicamente resinas e óleos essenciais. A resina é composta por alfa ácidos que depois de isomerizados conferem sabor amargo. Já os óleos essenciais, além de contribuírem com o sabor, têm grande importância na formação dos aromas característicos da cerveja (VENTURINI FILHO, 2000).

A água cervejeira é determinante na qualidade da bebida. A proporção entre os principais sais solúveis afeta o aroma e a cor da bebida. Esses sais são principalmente bicarbonato, cloreto e sulfato de cálcio, sódio e magnésio. A água deve ainda apresentar requisitos básicos como: ser potável, transparente, incolor, inodora, estar livre de qualquer sabor estranho e apresentar alcalinidade máxima de 50 ppm na fonte. Se estiver fora dos padrões pode ser quimicamente corrigida. (VENTURINI FILHO, 2000), (OETTERER, REGITANO-D'ARCE e SPOTO, 2006).

A levedura cervejeira não é considerada matéria-prima, pois atua apenas como agente de transformação bioquímica dos ingredientes através da fermentação

alcoólica. A levedura utilizada para a fabricação de cerveja é a *Saccharomyces cerevisiae* (VENTURINI FILHO, 2000).

Alguns aditivos são adicionados à cerveja com o intuito de facilitar o processamento e melhorar as características organolépticas ou mantê-las, tais como: enzimas, antioxidantes, estabilizantes de espuma e caramelo (KUNZE, 2010).

2.2. Processamento da cerveja

O processo de fabricação da cerveja, segundo Kunze (2010), segue o fluxograma apresentado na Figura 1.

A matéria-prima é recebida e armazenada em local adequado de acordo com suas características. O malte passa por um processo de limpeza, onde são retiradas impurezas, principalmente pedras, que podem danificar o moinho. Após passa pelo processo de moagem, em um moinho de martelos, assim como os adjuntos, por exemplo, *flakes* de milho. O produto moído é pesado em uma célula de carga e posteriormente adicionado em uma tina de mosturação, juntamente com água quente, de 38 a 50°C.

O malte possui algumas enzimas intrínsecas como glucanases e amilases que tem a função de hidrolisar o amido do grão em açúcares menores, e as proteases, que tem a função de hidrolisar proteínas, melhorando a estabilidade da espuma do produto final. Porém, para facilitar esse processo são adicionadas algumas enzimas ao mosto, normalmente aquelas que possuem atividades enzimáticas semelhantes as do malte.

Para melhor atuação, tanto das enzimas naturais quanto das adicionadas, é feito um ajuste do pH do mosto, assim como sua temperatura é aumentada gradativamente, proporcionando condições ótimas de atuação de cada enzima, como mostra a Figura 2.

Após a mosturação, a parte insolúvel do mosto deve ser separada por meio de um filtro; o próprio material insolúvel (casca de malte, resíduo de parede celular e proteínas coaguladas) serve de leito filtrante. É então feita a lavagem do bagaço com água a 75°C para maior recolhimento do extrato solúvel. A torta formada pela filtração é recuperada em forma de bagaço e pode ser reaproveitada para ração animal.

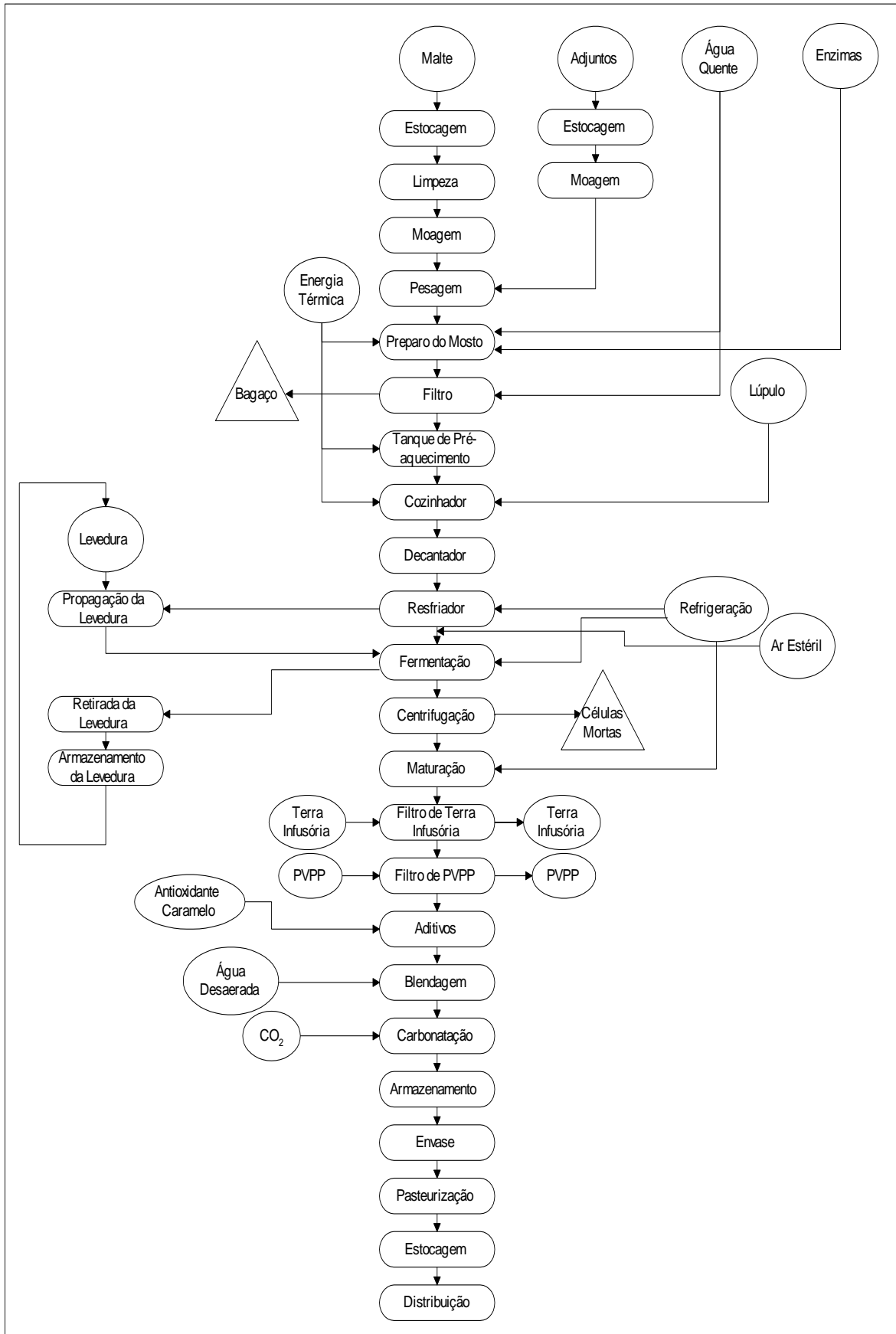


Figura 1 – Fluxograma de processamento de cerveja

Fonte: KUNZE, 2010 – Adaptado pela Autora

Conforme o mosto vai sendo filtrado, este vai sendo depositado em um tanque de pré-aquecimento. Este tanque, que antecede o cozinhador, tem por objetivo manter a temperatura do mosto alta, porque se fosse diretamente ao cozinhador os primeiros volumes sofreriam superaquecimento, pois o aquecimento do cozinhador é mais vigoroso. Depois de todo o volume filtrado, esse conteúdo é passado para o cozinhador, onde é adicionado o lúpulo. Nesse tanque o mosto segue rampas de temperatura (Figura 2) e pressão específicas para a correta extração dos *flavours* do lúpulo, coagulação de proteínas e taninos, inativação de enzimas e desenvolvimento de cor aroma e sabor. Por causa dessa etapa, onde o mosto é fervido, o extrato do mosto é concentrado. Além disso, alguns compostos voláteis que conferem odor desagradável à cerveja são eliminados. A Figura 2 apresenta em linha contínua o processo de mosturação onde todo o mosto passa junto pelo mesmo tratamento; a linha pontilhada é uma sugestão de divisão do mosto em três partes, sendo que cada uma segue o seu tratamento (1,2 e 3) e depois as partes são novamente misturadas, o objetivo é obter uma melhor hidrólise.

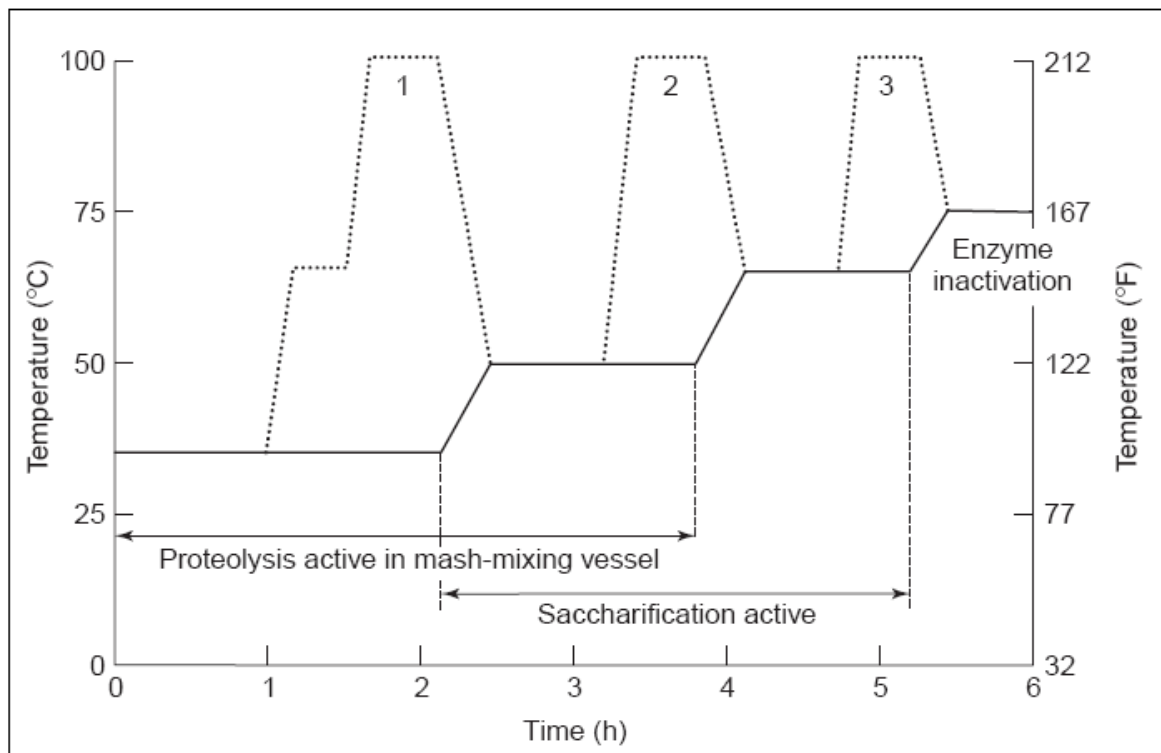


Figura 2 – Gráfico das rampas de temperatura

Fonte: BRIGGS, 2004.

Depois da fervura o mosto passa por um decantador, onde serão retiradas principalmente as proteínas coaguladas e o bagaço do lúpulo, melhorando a estabilidade da cerveja.

O mosto então é resfriado em trocador de placas de 100°C até aproximadamente 6°C (temperatura ideal de inoculação da levedura), aerado e transferido para tanques fermentadores. Esta aeração deve se feita com ar estéril ou oxigênio e tem o objetivo de proporcionar ambiente favorável à fermentação do mosto.

Paralelamente ao fluxo da cerveja, a levedura deve ser multiplicada em tanques específicos. O substrato para essa multiplicação é uma pequena quantidade de mosto já produzido. Esse fermento, já multiplicado, é então inoculado, sendo injetado na tubulação onde está sendo transferido o mosto resfriado para o fermentador.

A etapa de fermentação dura em média 8 dias, passando por duas etapas: a primeira com temperatura mais baixa, de 6 a 12°C, e a segunda com temperatura mais alta, de 10 a 15°C. Essas temperaturas são controladas pelo sistema de resfriamento dos tanques. A fermentação transforma o mosto em cerveja com a transformação de açúcares em álcool e gás carbônico. Ao final da fermentação a temperatura do mosto é diminuída e o fermento decanta no cone que existe no fundo do tanque fermentador. O fermento é retirado por baixo e transferido a outro tanque onde será armazenado e reutilizado por aproximadamente 5 vezes.

Como ainda existem muitas células mortas na cerveja, esta passa por uma centrifugação para clarificação e então é transferida para um tanque maturador. A maturação ocorre à temperatura próxima a 0°C e dura de 2 a 4 dias. O principal objetivo da maturação é melhorar o odor e o sabor da cerveja pela redução da concentração de diacetil, aldeídos e ácido sulfúrico.

A cerveja maturada passa novamente por um resfriador para manter sua temperatura baixa durante o processo (aproximadamente 0°C), evitando o espumamento. Depois disso, passa por dois filtros: um de terra infusória e outro de PVPP (polivinilpolipirrolidona). O filtro de terra infusória tem por objetivo clarificar a cerveja com a retirada de resíduos de células mortas de levedura, e o filtro de PVPP confere estabilidade à bebida, pois reduz o nível de polifenol (tanino), diminuindo a possibilidade de formação do complexo proteína-tanino que causa turvação na cerveja engarrafada.

Depois de filtrada a cerveja recebe alguns aditivos como antioxidante, caramelo e estabilizante de espuma. Até esta etapa a cerveja pode estar concentrada, isto é, desde o início do seu processamento foi adicionada menos água do que o necessário. Esta prática é muito utilizada por economia de tempo e espaço nos tanques, trabalhando-se sempre com um volume menor de líquido. Assim, a cerveja deve ser diluída conforme a especificação, sendo esse processo chamado de “blendagem” e se dá com a adição de água desaerada fria, aproximadamente 0°C. É muito importante que o teor de oxigênio dissolvido nesta água de blendagem seja muito baixo, em torno de 10 ppb, evitando o aumento de teor de oxigênio dissolvido na cerveja, o que leva a oxidação, reduzindo a qualidade sensorial da bebida.

Apesar de ter formação de CO₂ durante a fermentação, é muito difícil manter um padrão de concentração desse gás, portanto, normalmente se adota a prática de carbonatação da cerveja, isto é, adição de CO₂. Esse gás pode ser adquirido em empresas especializadas ou recuperado da própria fermentação da cerveja. No último caso, deve ser purificado antes da utilização. Depois dessa etapa a cerveja está pronta para ser envasada.

Antes do envase, a cerveja fica armazenada em tanques de pressão com isolamento térmico que mantém a temperatura baixa, importante para que não haja espumamento na hora do envase. É muito importante que exista uma contrapressão de CO₂ no tanque, mantendo o nível desse gás incorporado na bebida e evitando a incorporação de O₂.

A cerveja é normalmente envasada em garrafas retornáveis de 600 mL ou 1 litro ou latas de 350 ou 473 mL. Já envasadas passam pelo processo de pasteurização que vai garantir a qualidade microbiológica da bebida. Normalmente as embalagens passam por um túnel de pasteurização, que por aspensão de água aquece o líquido a aproximadamente 65°C e mantém essa temperatura por 20 minutos e do mesmo modo resfria até aproximadamente 35°C.

As garrafas ou latas são embaladas, paletizadas e estocadas até a distribuição. As condições de estocagem e transporte são muito importantes para manter a qualidade do produto, deve-se evitar luz e calor excessivos.

2.3. Qualidade sensorial da cerveja

Tanto para a cerveja como para qualquer outro produto alimentício, alguns aspectos de qualidade mudam durante a estocagem. Há algum tempo atrás o que determinava a vida de prateleira da cerveja era a questão microbiológica, que atualmente está sob controle. Hoje, a atenção está mais voltada para os efeitos das mudanças sensoriais da cerveja, principalmente no que diz respeito a aromas (VANDERHAEGEN et al., 2006).

Aparência, sabor e odor são as características que o consumidor avalia cada vez que toma um copo de cerveja. Cor, limpidez e formação de espuma são características de aparência que podem ser fisicamente medidas, e também avaliadas através de análise sensorial. Já as características de sabor e odor, de forma geral, não podem ser física ou quimicamente medidas, portanto, conta-se somente com a análise sensorial para avaliação desses atributos (IBD, 2008).

O maior problema da qualidade sensorial da cerveja é a formação de *off-flavours* durante o processamento ou com o envelhecimento após envase (SOVRANO, BUIATTI e ANESE, 2006).

A cerveja é considerada uma solução água-etanol com centenas de diferentes moléculas dissolvidas, originadas do processamento das matérias-primas. Porém, uma cerveja recém envasada não está em equilíbrio químico e é por isso que durante o tempo de armazenamento reações de transformações continuam ocorrendo, procurando chegar ao estado de menor energia e máxima entropia (VANDERHAEGEN et al., 2006).

A Figura 3 evidencia a instabilidade do *flavour* da cerveja ao longo do envelhecimento, onde compostos vão se modificando e formando *off-flavours*. É essa instabilidade que determina a vida de prateleira do produto (DALGLIESH¹, 1977 apud VANDERHAEGEN et al., 2006).

¹ DALGLIESH, C. E. (1977). Flavour stability. *Proceedings of the European Brewery Convention Congress*, (623–659)

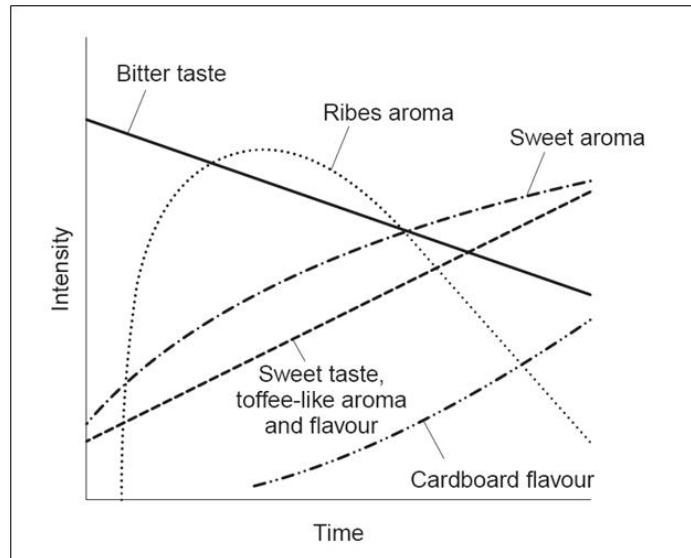


Figura 3 – Representação das mudanças sensoriais da cerveja durante o envelhecimento

Fonte: DALGLIESH¹, 1977 apud VANDERHAEGEN et al., 2006

Apesar de muitos anos de estudo, ainda não há um consenso entre os estudiosos sobre a origem dos compostos que causam os *off-flavours* na cerveja, principalmente o de “papelão”, que em menor intensidade pode ser caracterizado como “grão/palha”. Porém, a maioria deles acredita que o envelhecimento da cerveja pode ser atribuído à oxidação de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoléico (BAMFORTH, 2003).

As reações de oxidação parecem ser o principal mecanismo de deterioração da cerveja. Além do tempo, a temperatura também acelera as reações de oxidação, envelhecendo a bebida mais rapidamente. Para manter a estabilidade dos *flavours* da cerveja por mais tempo, as cervejarias devem selecionar matérias-primas de qualidade, processá-las adequadamente e armazenar o produto final em temperatura baixa (OETTERER, REGITANO-D’ARCE E SPOTO, 2006).

A oxidação de ácidos graxos a aldeídos está associada com o *off-flavour* de “papelão”. O principal composto que se forma com a oxidação e que transfere à cerveja o *off-flavour* de “papelão” é o *trans*-2-nonenal (IBD, 2008). O *trans*-2-nonenal é um acetaldeído (fórmula química apresentada na Figura 4) que, segundo Santos (2002), é determinante na qualidade organoléptica de uma cerveja.

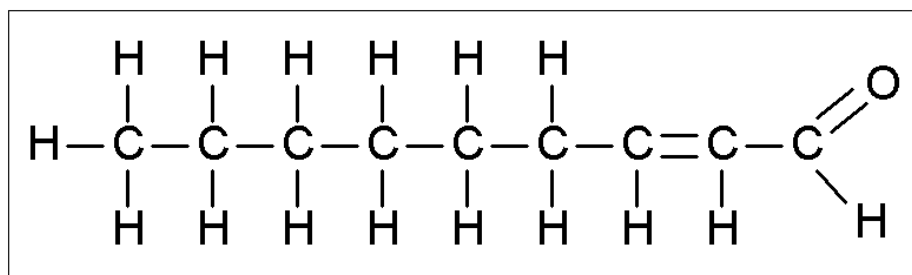


Figura 4 – Fórmula química do *trans*-2-nonenal

Saison et al. (2009) determinaram o *threshold* do *trans*-2-nonenal em cerveja, e encontraram um valor de 0,03 ppb. Esse valor extremamente baixo demonstra a importância desse composto no envelhecimento da cerveja, pois pequenas concentrações já poderão ser percebidas.

A identificação dos mecanismos responsáveis pela formação do *trans*-2-nonenal ainda não está completamente conhecida, além do que a importância de cada um desses mecanismos dependerá das matérias-primas utilizadas e das condições do processo de fabricação (SANTOS, 2002).

Segundo Bamforth (1999) o aumento do *flavour* de “papelaço” causado pelo *trans*-2-nonenal durante o armazenamento está ligado aos processos iniciais de produção, moagem e mosturação. Nessas etapas pode ocorrer a oxidação de ácido linoléico e então o aparecimento do *trans*-2-nonenal. A oxidação do ácido linoléico pode ocorrer por duas diferentes rotas: auto-oxidação e oxidação enzimática através da lipoxigenase (LOX).

A auto-oxidação do ácido linoléico começa pela remoção homolítica de um hidrogênio por uma espécie radicalar existente na matriz. O mecanismo da auto-oxidação prossegue pela adição de uma molécula de oxigênio ao ácido linoléico radical, seguida de uma nova remoção homolítica de um hidrogênio de espécies presentes no meio conduzindo à formação de um hidroperóxido. A reação subsequente envolve a cisão do hidroperóxido com a formação dos produtos de degradação do ácido linoléico (BELITZ e GROSCH², 1987 apud SANTOS, 2002).

Segundo Lewis e Bamforth (2006), a oxidação enzimática do ácido linoléico começa com a ação da enzima lipoxigenase (formada durante o processo de germinação da cevada) que catalisa a formação de hidroperóxidos. A degradação desses hidroperóxidos dá origem ao *trans*-2-nonenal, conforme a Figura 5.

² BELITZ, H.D.; GROSCH, W. Food chemistry. Londres: Springer-Verlag, 1987 (644-654)

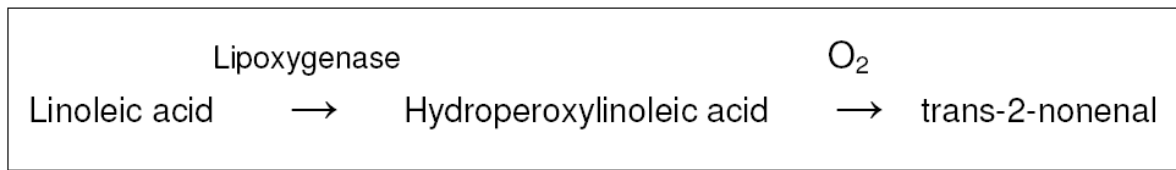


Figura 5 – Oxidação enzimática do ácido linoléico

Fonte: IBD, 2008.

Durante o processo de fermentação ocorre a formação e o consumo de acetaldéidos, conforme mostra a Figura 6. O acetaldéido é uma via secundária de formação de álcool, se acumula na cerveja durante o período de crescimento ativo da levedura e declina na fase estacionária do crescimento das células, no final da fermentação. Nesse processo o *trans*-2-nonenal produzido nas etapas anteriores pode ser reduzido ao seu álcool correspondente, porém, essa reação é reversível e depois do envase o *trans*-2-nonenal pode voltar a aparecer (SENAI, 1999).

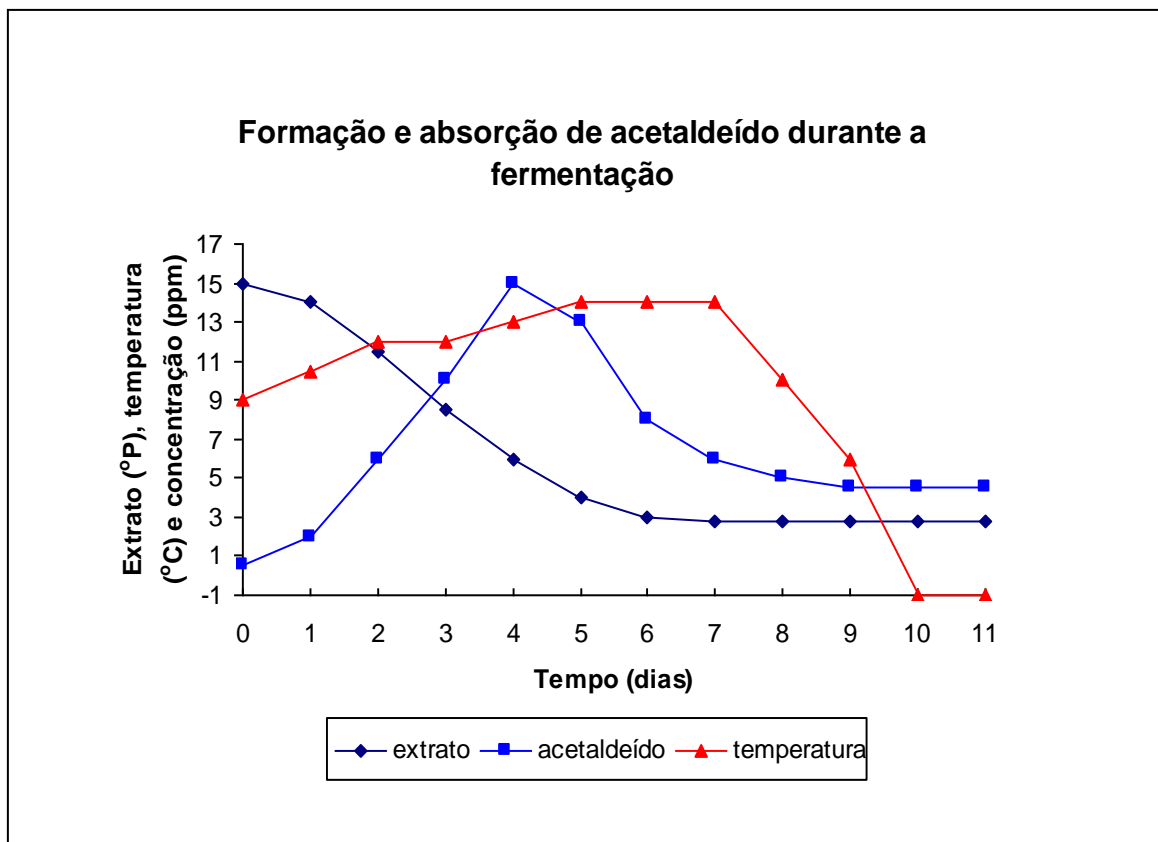


Figura 6 – Formação e absorção de acetaldéidos durante a fermentação

Fonte: SENAI, 1999

Existem várias explicações do porque do *off-flavour* de “papelão” não aparecer durante o processamento e nem em cervejas frescas. Lermusieau³ et al. (1999 apud SANTOS, 2002) estudaram a formação de bases de *Shiff* entre o *trans*-2-nonenal e a proteína lisina e concluíram que o aumento de temperatura desloca esse equilíbrio no sentido da formação dessas bases e a diminuição da temperatura pode levar a dissociação destas. Esse comportamento leva a crer que na etapa de ebulição do mosto ocorre a formação de bases de *Shiff* e posterior dissociação destas durante o armazenamento, deixando o *trans*-2-nonenal livre. Além disso, a formação das bases de *Shiff* protege esse acetaldeído do consumo pela levedura na fase de fermentação. Já Bamforth (2003) sugere que a oxidação durante o processamento vai até um intermediário que com o tempo de armazenamento se decompõe e o *trans*-2-nonenal é formado. Outra razão que o mesmo autor sugere é que o *trans*-2-nonenal formado durante o processamento se liga com antioxidantes naturalmente formados no processo de fermentação, normalmente o SO₂, e à medida que a concentração de *trans*-2-nonenal vai aumentando por outras vias de formação, a concentração desse antioxidante vai diminuindo, deixando o *trans*-2-nonenal livre, e então passa a ser perceptível sensorialmente. Pode-se concluir que se o processo de fermentação não for adequado, não consumirá todos os acetaldeídos formados nessa etapa, e estes vão se ligar ao SO₂ diminuindo a concentração desse antioxidante e conseqüentemente deixando mais moléculas de *trans*-2-nonenal livres.

Além do antioxidante produzido naturalmente pela fermentação, a indústria cervejeira costuma adicionar outros antioxidantes que irão inibir os efeitos negativos dos compostos oxidantes, em particular o oxigênio, evitando reações responsáveis pelas alterações nas características organolépticas da cerveja, ou ainda se ligando aos compostos formados pela oxidação formando um composto inativo organolepticamente. Os antioxidantes mais comumente usados são os ascorbatos e os sulfitos (SANTOS, 2002). A Figura 7 mostra a ligação entre o *trans*-2-nonenal e o sulfito.

³ LERMUSIEAU, G. et al., (1999). Nonoxidative mechanism for development of *trans*-2-nonenal. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57 (29-33)

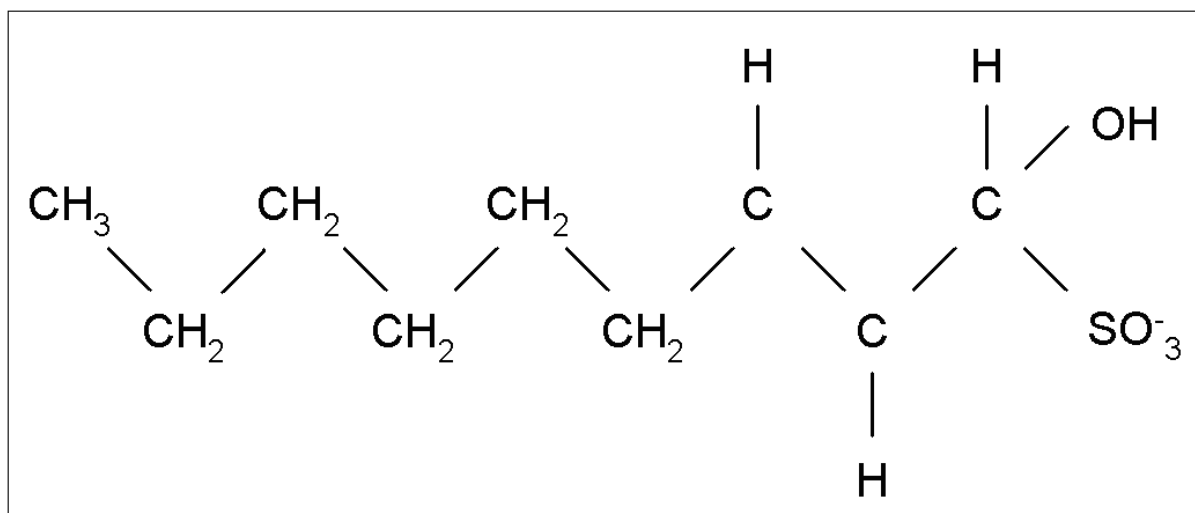


Figura 7 – Produto da interação entre o sulfito e o *trans*-2-nonenal

Uma quantidade excessiva de oxigênio pode causar uma rápida mudança no aroma e no sabor do produto. Nos últimos anos ficou evidente que os níveis de oxigênio durante todo o processamento podem afetar a vida de prateleira da cerveja (VANDERHAEGEN et al., 2006). Também durante o período de armazenamento a maior parte das mudanças químicas que ocorrem envolvem o oxigênio, portanto serão aceleradas se houver contato com oxigênio depois da etapa de fermentação (IBD, 2008). Porém, apesar de se cuidar para que a cerveja não incorpore oxigênio depois da fermentação, elas acabam envelhecendo, o que nos remete ao primeiro fato já descrito de que a formação de precursores ou até mesmo do próprio *trans*-2-nonenal pode ocorrer já nas primeiras etapas de fabricação da cerveja (BAMFORTH, 2003).

As mudanças de temperatura prejudicam a qualidade sensorial da cerveja. A Lei de Van't Hoff prevê uma duplicação na taxa de reação química a cada aumento de 10°C na temperatura (IBD, 2008). Deve-se tomar cuidado com o superaquecimento da cerveja em pontos críticos. No cozimento do mosto deve-se evitar que a cerveja permaneça por tempo maior que o necessário, pois está a alta temperatura. Durante a pasteurização deve-se ter especial atenção para que as temperaturas e tempo estejam de acordo com o projetado, principalmente no resfriamento final. Já durante o transporte e armazenamento deve-se evitar exposição ao sol (BRIGGS et al., 2004).

Para Santos (2002) está claro que o oxigênio provoca a liberação de radicais livres que vão reagir com compostos presentes na cerveja levando a rápidas

mudanças no perfil do sabor do produto. Porém, o autor evidencia que existem na cerveja moléculas com reatividade suficiente para interagir e formar compostos de envelhecimento. As reações não-oxidativas que causam alteração no sabor são, por exemplo, esterificação, reação de Maillard e hidrólise de ésteres. Até mesmo o *trans*-2-nonenal que historicamente é a principal causa do sabor oxidado, paradoxalmente pode surgir por mecanismos não-oxidativos.

Apesar de muitos estudos, ainda não está claro qual a importância de cada reação e de cada composto formado para o sabor de oxidação/papelão que tanto prejudica a qualidade da cerveja. Portanto, continua sendo importante avaliar a relevância de determinadas reações e compostos formados, pois um melhor conhecimento desses mecanismos envolvidos no envelhecimento da cerveja permite um estudo mais minucioso dos efeitos sobre os parâmetros de qualidade da cerveja e das ações preventivas.

3. ARTIGO – “Efeito do *trans*-2-nonenal na qualidade sensorial da cerveja”

Resumo

A mudança do perfil sensorial da cerveja ao longo do envelhecimento tem sido apontada como um dos maiores problemas de qualidade nessa bebida. Um dos *off-flavours* bastante conhecido é o associado ao “papelão” ou “cerveja oxidada”. Esse *off-flavour* tem sido associado ao composto *trans*-2-nonenal, um acetaldeído. O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os fatores que levam a formação desse composto, analisar através de HPLC a quantidade de *trans*-2-nonenal presente em diferentes amostras de cerveja e posteriormente realizar análise sensorial de duas amostras com diferentes níveis de *trans*-2-nonenal, com o intuito de verificar a influência da presença desse composto na qualidade sensorial da cerveja. Foi observado que o nível desse composto aumenta com o envelhecimento da cerveja e que o sabor de cerveja oxidada, ou *off-flavour* de “papelão”, está diretamente ligado ao nível de *trans*-2-nonenal presente na bebida.

Abstract

The change in the sensory profile of the beer throughout the aging process has been identified as a major quality problem in this beverage. One of the off-flavors well known is the one whose is associated with the "cardboard" or "oxidized beer." This off-flavor has been linked to the compound *trans*-2-nonenal, an acetaldehyde. The objective of this research was to evaluate the factors that lead to the formation of this compound, to analyze by HPLC the amount of *trans*-2-nonenal present in different samples of beer and then perform a sensory analysis of two samples with different levels of *trans*-2-nonenal in order to verify the influence of the presence of this compound on sensory quality of beer. It was observed that the level of this compound increases with the aging of the beer and that the oxidized flavor of beer, or "cardboard" off-flavor, is directly linked to the level of *trans*-2-nonenal in this beverage.

1. Introdução

Tanto para a cerveja como para qualquer outro produto alimentício, alguns aspectos de qualidade mudam durante a estocagem. Há algum tempo atrás o que determinava a vida de prateleira da cerveja era a avaliação microbiológica, que atualmente está sob controle. Hoje, a atenção está mais voltada para os efeitos das mudanças sensoriais da cerveja, principalmente no que diz respeito a aromas (VANDERHAEGEN et al., 2006).

O maior problema da qualidade sensorial da cerveja é a formação de *off-flavours* durante o processamento ou com o envelhecimento após envase (SOVRANO, BUIATTI e ANESE, 2006). De forma geral, essas características não podem ser física ou quimicamente medidas, portanto, conta-se somente com a análise sensorial para avaliação desses atributos como um todo (IBD, 2008).

Apesar de muitos anos de estudo, ainda não há um consenso entre os pesquisadores sobre a origem dos compostos que causam os *off-flavours* na cerveja, principalmente o de “papelão”, que em menor intensidade pode ser caracterizado como “grão/palha”. Porém, a maioria deles acredita que o envelhecimento da cerveja pode ser atribuído à oxidação de ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido linoléico (BAMFORTH, 2003).

As reações de oxidação parecem ser o principal mecanismo de deterioração da cerveja. A temperatura acelera as reações de oxidação, envelhecendo a bebida mais rapidamente (OETTERER, REGITANO-D'ARCE E SPOTO, 2006).

O principal composto que se forma com a oxidação e que transfere à cerveja o *off-flavour* de “papelão” é o *trans-2-nonenal* (IBD, 2008). O *trans-2-nonenal* é um acetaldeído que, segundo Santos (2002), é determinante na qualidade organoléptica de uma cerveja.

Saison et al. (2009) determinaram o *threshold* do *trans-2-nonenal* em cerveja, e encontraram um valor de 0,03 ppb. Esse valor extremamente baixo demonstra a importância desse composto no envelhecimento da cerveja, pois pequenas concentrações já poderão ser percebidas.

A identificação dos mecanismos responsáveis pela formação do *trans-2-nonenal* ainda não está completamente conhecida, além do que a importância de cada um desses mecanismos dependerá das matérias-primas utilizadas e das condições do processo de fabricação (SANTOS, 2002).

Segundo Bamforth (1999) o aumento do *flavour* de “papelão” causado pelo *trans-2-nonenal* durante o armazenamento está ligado aos processos iniciais de produção, moagem e mosturação. Nessas etapas pode ocorrer a oxidação de ácido linoléico e então o aparecimento do *trans-2-nonenal*. A oxidação do ácido linoléico pode ocorrer por duas diferentes rotas: auto-oxidação e oxidação enzimática através da lipoxigenase (LOX).

A auto-oxidação do ácido linoléico começa pela remoção homolítica de um hidrogênio por uma espécie radicalar existente na matriz. O mecanismo da auto-oxidação prossegue pela adição de uma molécula de oxigênio ao ácido linoléico radical, seguida de uma nova remoção homolítica de um hidrogênio de espécies presentes no meio conduzindo à formação de um hidroperóxido. A reação subsequente envolve a cisão do hidroperóxido com a formação dos produtos de degradação do ácido linoléico (BELITZ e GROSCH¹, 1987 apud SANTOS, 2002).

Segundo Lewis e Bamforth (2006), a oxidação enzimática do ácido linoléico começa com a ação da enzima lipoxigenase (formada durante o processo de germinação da cevada) que catalisa a formação de hidroperóxidos. A degradação desses hidroperóxidos dá origem ao *trans-2-nonenal*.

Durante o processo de fermentação ocorre a formação e o consumo de acetaldeídos. O acetaldeído é uma via secundária de formação de álcool, se acumula na cerveja durante o período de crescimento ativo da levedura e declina na fase estacionária do crescimento das células, no final da fermentação. Nesse processo o *trans-2-nonenal* produzido nas etapas anteriores pode ser reduzido ao seu álcool correspondente, porém, essa reação é reversível e depois do envase o *trans-2-nonenal* pode voltar a aparecer (SENAI, 1999).

Existem várias explicações do porque do *off-flavour* de “papelão” não aparecer durante o processamento e nem em cervejas frescas. Lermusieau² et al. (1999 apud SANTOS, 2002) estudaram a formação de bases de *Shiff* entre o *trans-2-nonenal* e a proteína lisina e concluíram que o aumento de temperatura desloca esse equilíbrio no sentido da formação dessas bases e a diminuição da temperatura pode levar a dissociação destas. Esse comportamento leva a crer que na etapa de ebulição do mosto ocorre a formação de bases de *Shiff* e posterior dissociação destas durante o

¹ BELITZ, H.D.; GRASCH, W. Food chemistry. Londres: Springer-Verlag, 1987 (644-654)

² LERMUSIEAU, G. et al., (1999). Nonoxidative mechanism for development of *trans-2-nonenal*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57 (29-33)

armazenamento, deixando o *trans*-2-nonenal livre. Além disso, a formação das bases de *Shiif* protege esse acetaldeído do consumo pela levedura na fase de fermentação. Já Bamforth (2003) sugere que a oxidação durante o processamento vai até um intermediário, ainda não identificado, que com o tempo de armazenamento se decompõe e o *trans*-2-nonenal é formado. Outra razão que o mesmo autor sugere é que o *trans*-2-nonenal formado durante o processamento se liga com antioxidantes naturalmente formados no processo de fermentação, normalmente o SO₂, e à medida que a concentração de *trans*-2-nonenal vai aumentando por outras vias de formação, a concentração desse antioxidante vai diminuindo, deixando o *trans*-2-nonenal livre, e então passa a ser perceptível sensorialmente. Pode-se concluir que se o processo de fermentação não for adequado, não consumirá todos os acetaldeídos formados nessa etapa, e estes vão se ligar ao SO₂ diminuindo a concentração desse antioxidante e consequentemente deixando mais moléculas de *trans*-2-nonenal livres.

Além do antioxidante produzido naturalmente pela fermentação, a indústria cervejeira costuma adicionar outros antioxidantes que irão inibir os efeitos negativos dos compostos oxidantes, em particular o oxigênio, evitando reações responsáveis pelas alterações nas características organolépticas da cerveja, ou ainda se ligando aos compostos formados pela oxidação formando um composto inativo organolepticamente (SANTOS, 2002).

Uma quantidade excessiva de oxigênio pode causar uma rápida mudança no aroma e no sabor do produto. Nos últimos anos ficou evidente que os níveis de oxigênio durante todo o processamento podem afetar a vida de prateleira da cerveja (VANDERHAEGEN et al., 2006). Também durante o período de armazenamento a maior parte das mudanças químicas que ocorrem envolvem o oxigênio, portanto serão aceleradas se houver contato com oxigênio depois da etapa de fermentação (IBD, 2008). Porém, apesar de se cuidar para que a cerveja não incorpore oxigênio depois da fermentação, elas acabam envelhecendo, o que nos remete ao primeiro fato já descrito de que a formação de precursores ou até mesmo do próprio *trans*-2-nonenal pode ocorrer já nas primeiras etapas de fabricação da cerveja (BAMFORTH, 2003).

As mudanças de temperatura prejudicam a qualidade sensorial da cerveja. A Lei de Van't Hoff prevê uma duplicação na taxa de reação química a cada aumento de 10°C na temperatura (IBD, 2008). Deve-se tomar cuidado com o superaquecimento

da cerveja em pontos críticos. No cozimento do mosto deve-se evitar que a cerveja permaneça por tempo maior que o necessário, pois está a alta temperatura. Durante a pasteurização deve-se ter especial atenção para que as temperaturas e tempo estejam de acordo com o projetado, principalmente no resfriamento final. Já durante o transporte e armazenamento deve-se evitar exposição ao sol (BRIGGS et al., 2004).

Para Santos (2002) está claro que o oxigênio provoca a liberação de radicais livres que vão reagir com compostos presentes na cerveja levando a rápidas mudanças no perfil do sabor do produto. Porém, o autor evidencia que existem na cerveja moléculas com reatividade suficiente para interagir e formar compostos de envelhecimento. As reações não-oxidativas que causam alteração no sabor são, por exemplo, esterificação, reação de Maillard e hidrólise de ésteres. Até mesmo o *trans*-2-nonenal que historicamente é a principal causa do sabor oxidado, paradoxalmente pode surgir por mecanismos não-oxidativos.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da presença do composto *trans*-2-nonenal na qualidade sensorial da cerveja.

2. Material e Métodos

2.1. Instrumentação

Sistema de destilação por arraste de vapor da marca Marconi, modelo MA-036/Plus para destilação da amostra de cerveja. Pré-coluna Nucleosil ODS recheio C18 (8mm X 4mm, tamanho de partícula 5µm) da marca Macherey-Nagel para purificação da amostra. Conjunto para HPLC marca Agilent modelo 1100 com detector espectrofotométrico selecionado para um comprimento de onda de 226nm e software Agilent ChemStation para processamento dos dados. Coluna para HPLC marca Grace/Vydac com recheio C18 modelo 218TP54 (4,6mm X 250mm, tamanho de partícula 5µm). Bomba de vácuo da marca Quimis, modelo Q-355B para filtrar o solvente acetonitrila e para viabilizar a passagem da amostra pela pré-coluna. Filtro *Simplicity UV Water Purification System* da marca Millipore, modelo SIMSV00WW, para produção de água ultra pura (Mili-Q). Para realização de todos os procedimentos foram utilizados vidrarias e materiais básicos de laboratório. Para a análise sensorial foram utilizadas taças de cristal transparentes com cabo.

2.2. Reagentes Químicos

Para produção da curva de calibração para quantificação dos resultados do HPLC foi utilizado um padrão do composto *trans*-2-nonenal obtido da Sigma-Aldrich com 97% de pureza. Foi utilizado acetonitrila da Merck para preparação das amostras e como parte da fase móvel do sistema de HPLC (água ultrapura:acetonitrila, 50:50, v/v). Para a preparação das amostras, sempre que necessário, foi utilizada água ultra pura (Mili-Q). Para a preparação da amostra de cerveja foi utilizado NaCl da marca Nuclear

2.3. Amostras

Amostras de cerveja tipo Pilsen em embalagem de lata de 473 ml foram submetidas a envelhecimento natural em sala de estabilidade com temperatura controlada (25°C) com o objetivo de obter amostras com idade entre 1 e 4 meses. A vida de prateleira desse produto é de 6 meses.

2.4. Quantificação do *trans*-2-nonenal

Para quantificação dos resultados obtidos através do HPLC foi produzida uma curva de calibração utilizando soluções modelo com diferentes concentrações do padrão do *trans*-2-nonenal em acetonitrila. As concentrações utilizadas foram $1,64 \times 10^{-8}$ g/mL, $1,64 \times 10^{-7}$ g/mL, $6,53 \times 10^{-7}$ g/mL, $1,30 \times 10^{-6}$ g/mL, $3,27 \times 10^{-6}$ g/mL, $6,53 \times 10^{-6}$ g/mL. Essas concentrações foram preparadas a partir de uma solução estoque preparada com 1 µl do padrão em 5 mL de acetonitrila.

Através da leitura das concentrações das soluções modelo por HPLC obteve-se a curva de calibração com um R^2 de 0,9973.

Para a determinação da concentração de *trans*-2-nonenal nas amostras de cerveja foi utilizada uma metodologia proposta por Santos (2002), a qual divide-se em 3 etapas: (a) destilação da amostra de cerveja por arraste de vapor para uma prévia separação do *trans*-2-nonenal dos compostos da matriz; (b) passagem do destilado recolhido por uma pré-coluna de extração em fase sólida do tipo C18 e recolha dos compostos retidos, para uma nova separação dos compostos da matriz e ainda para uma concentração do *trans*-2-nonenal; (c) análise do concentrado por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detecção espectrofotométrica para quantificação do *trans*-2-nonenal.

(a) *Destilação da cerveja por arrastamento de vapor*

Mediu-se 100 ml de cerveja no tubo para destilação. Acrescentou-se 1g de NaCl e homogeneizou-se a solução. A destilação da amostra iniciou quando a água geradora de vapor entrou em ebulição. Após 10 minutos recolheu-se 20 mL de solução.

(b) Passagem do destilado pela pré-coluna

Foi realizado o condicionamento da pré-coluna, no qual passou-se 8 ml de acetonitrila para remover impurezas e ainda ativar o enchimento. Em seguida passou-se 8 ml de água ultra pura também para eliminar impurezas e ainda eliminar qualquer vestígio de acetonitrila. Depois do condicionamento passou-se pela pré-coluna o destilado recolhido anteriormente (a um fluxo de 1-2 gotas por segundo). No final dessa passagem passou-se 8 ml de água ultrapura e secou-se o enchimento. O *trans*-2-nonenal que ficou retido na pré-coluna, foi recolhido com a passagem de 1 mL de acetonitrila. Durante todo esse processo (b) a pré-coluna deve estar acoplada a um sistema de vácuo para possibilitar a passagem dos líquidos.

(c) Análise da amostra obtida em (b)

0,5ml da amostra obtida em (b) foi colocada dentro de um *vial* e este foi posicionado no HPLC. As condições cromatográficas utilizadas foram:

- Fase estacionária: coluna C18
- Fase móvel: acetonitrila:água ultra pura, 50:50, v/v
- Fluxo do eluente: 1,00 mL/min
- Comprimento de onda: 226nm
- Atenuação: 1

Para quantificação do *trans*-2-nonenal utilizou-se a curva de calibração previamente produzida.

2.5. Análise Sensorial

Foram selecionadas 2 amostras com diferentes concentrações de *trans*-2-nonenal para realização da análise sensorial. Foi utilizada uma equipe de 5 degustadores *experts* em cerveja e oferecidas as duas amostras com diferentes codificações contendo 3 dígitos aleatórios a uma temperatura de 5°C em taças de cristal. A ficha utilizada foi previamente estruturada com uma listagem de possíveis defeitos (Figura 1), e local para quantificação desses defeitos de acordo com a tabela de intensidades (Figura 2). As análises foram realizadas em laboratório

específico com cabines individuais, com temperatura agradável e silêncio para possibilitar concentração dos provadores. Para análise estatística foi utilizada a análise de variância, ANOVA, através do programa Excel 2007 (Microsoft®).

Nome:		Data:		
Associações			Amostra	
Aparência	Cor			
	Espuma/Lacing			
	Turvação			
	Sedimento/Flóculo			
Aroma e Gosto	Éster	Frutal	frutal, banana, manga, abacaxi, maçã, anis	
		Acetato de Etila	esmalte, verniz, solvente, acetona	
	Sulfúricos	DMS	milho, vegetal cozido	
		SO ₂	Fósforo queimado, antioxidante, poluição	
		H ₂ S	ovo cozido, ovo podre, esgoto, autólise	
		Mercaptana	gás de cozinha	
		Lightstruck	Autólise	
	Carbonilas	Diacetil	Gambá	
		Acetaldeído	Manteiga, odor adocicado	
	Fenóis	Clorofenol	maçã verde, vinho branco	
		Defumado	tinta, hospital, esparadrapo, medicamento	
		Fenólico	Defumado, bacon	
	Ácidos	Acético	cravo, especiarias, tempero	
		Lático	ácido láctico	
		Butírico	Vômito de bebê	
		Caprílico	sabão de côco, cera, sabão	
		Isovalérico	queijo parmesão, lúpulo velho, chulé	
	oxidação	Grão/Palha	grão de malte, palha, pó de malte	
		Papelão	papelão, papel molhado	
	Caramelo		Caramelo, bala toffee	
	Queimado		Queimado	
	Metálico		metálico e/ou odor de ferrugem na pele	
	Mofo		terra, solo úmido, porão	
Amargor	Intensidade	Quanto amargo		
	Remanescência	permanência na boca		
Sensação na Boca	Alcalino		Viscosidade, escorregadio	
	Acidez		Aperto das glândulas causando "água na boca"	
	CO ₂		"dor" nas papilas	
	Adstringente		"amarrando", trava, banana verde	
	Corpo		Preenchimento/viscosidade na boca	

Figura 1 – Listagem de possíveis defeitos utilizada na ficha para análise sensorial

Escala	Nível de Intensidade do Off-flavour	Sub divisão	Descrição
0	Nenhum	0	Ausência de <i>off-flavour</i>
1	Concentração mínima de detecção	1	Apenas notado, mas difícil de identificar
2 a 3	Fraco	2	Capaz de ser notado em intensidade muito fraca

		3	Capaz de ser notado em intensidade fraca
4 a 5	Claramente perceptível	4	Capaz de ser notado em intensidade moderada
		5	Capaz de ser notado em intensidade claramente perceptível
6 a 7	Forte	6	Capaz de ser notado em intensidade forte
		7	Capaz de ser notado em intensidade muito forte
8	Muito forte	8	Capaz de ser notado em intensidade extremamente forte
9	Extremamente forte	9	Dominante, o mais forte possível

Figura 2– Tabela de intensidades utilizada para a análise sensorial

3. Discussão dos Resultados

3.1. Quantificação do *trans-2-nonenal* nas amostras de cerveja

Através do método descrito e da equação obtida através da curva de calibração foi possível determinar a concentração de *trans-2-nonenal* nas amostras de cerveja levando-se em conta a área do pico obtido na cromatografia. O tempo de retenção do composto em questão foi em torno de 8,6 minutos.

Foram obtidas concentrações entre $1,89 \times 10^{-8} \text{g/mL}$ e $1,74 \times 10^{-7} \text{g/mL}$, o equivalente a 22 e 117ppb, respectivamente.

Acredita-se que a concentração do *threshold* (0,03 ppb) possa ser perceptível apenas para consumidores frequentes e com uma sensibilidade grande a esse *off-flavour* ou para degustadores *experts* em cerveja.

A amostra com menor nível de *trans-2-nonenal* foi aquela com idade de 1 mês, já a amostra com maior nível desse composto foi aquela com idade de 4 meses, o que está de acordo com Vanderhaegen et al. (2006), SENAI (1999), Santos (2002) e Bamforth (2003), que relacionam o envelhecimento da cerveja com o aumento do nível de *trans-2-nonenal*. Segundo IBD (2008), o nível do oxigênio dissolvido diminui rapidamente após o envase, porém, os *off-flavours* podem demorar a aparecer, o que acontece é a inicialização das reações de oxidação o que leva primeiramente à diminuição do nível de antioxidantes, tanto os naturais quando os adicionados à cerveja.

O método utilizado para determinação do teor de *trans-2-nonenal* em amostras de cerveja se aplica para análises de controle de qualidade em cervejarias, apesar de demorar em torno de 5 horas para a obtenção do resultado e devido as pré-colunas serem de custo elevado e terem tempo de utilização reduzido. Através da rastreabilidade pode-se chegar às causas de formação do composto e assim pode-se agir no processo para evitá-las.

3.2. Análise Sensorial

Para a realização da análise sensorial foram selecionadas as amostras com maior diferença de concentração de *trans*-2-nonenal, apresentadas e nomeadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração de *trans*-2-nonenal nas amostras selecionadas para análise sensorial

Amostra	Concentração (ppb)
A	22
B	117

Foram selecionados e tabelados apenas os resultados relativos ao defeito de oxidação (grão/palha e papelão). A média dos valores associados aos defeitos de oxidação foi de 0,8 para a amostra A e de 2,6 para a amostra B, o que está de acordo com Santos (2002) e IBD (2008), que relacionam o nível de *trans*-2-nonenal com o *off-flavour* de “papelão”. Vanderhaegen et al. (2007) estudaram as características de envelhecimento em diferentes tipos de cerveja e, através de análise sensorial de amostras com 180 dias, relacionou a aparecimento do *off-flavour* de “papelão” à formação de acetaldeídos durante o envelhecimento.

Através da análise estatística observou-se que houve diferença significativa entre as amostras e não houve diferença estatística e entre os provadores o que corrobora o treinamento eficaz destes.

Guyot-Declerck et al. (2004) descreveram avaliações sensoriais de mudanças no aroma de cervejas do tipo larger submetidas a envelhecimento forçado com diferentes valores de pH (4,2 e 4,6). Em cerveja com pH regular (4,2) foi observado um aumento do *off-flavour* gerado pelo *trans*-2-nonenal. Já com a amostra de pH mais elevado obteve-se menor percepção do *trans*-2-nonenal, o que foi relacionado com uma maior retenção do composto por aminoácidos e proteínas durante o envelhecimento a pH alto.

François et al. (2005) estudaram a influência do pH (3 ou 5), do teor de oxigênio (com e sem oxigênio) e do envelhecimento (0 ou 5 dias a 40°C – envelhecimento forçado) sobre a adstringência de cervejas do tipo larger. Através de análise sensorial concluíram que o pH exerce influência sobre a adstringência, quando maior o pH menor a adstringência. Já o teor de oxigênio e a idade da cerveja não foram importantes para esse atributo sensorial.

4. Conclusão

Através da quantificação do *trans*-2-nonenal nas amostras de cerveja pode-se observar que o nível desse composto aumenta com o envelhecimento da cerveja. Através da análise sensorial confirma-se que o sabor de cerveja oxidada, ou *off-flavour* de “papelão”, está diretamente ligado ao nível de *trans*-2-nonenal presente na bebida. Esse composto parece ser o mais importante para a formação do *off-flavour* de “papelão”, porém, outros compostos podem se formar através de reações de oxidação ou ainda por outras vias e contribuir com o *off-flavour* em questão. Portanto, há muito espaço para novas pesquisas em torno desse defeito sensorial, tanto pelo fato das rotas de formação do *trans*-2-nonenal ainda não estarem bem definidas quanto pela possibilidade de outros compostos transmitirem o *off-flavour* de “papelão” à cerveja.

Referências Bibliográficas

BAMFORTH, C.W. et al., (1999). Enzymic and Non-enzymic oxidation in the brewhouse: a theoretical consideration. **Department of Food Science & Technology**. University of California. Volume 105, n° 4 (237-242). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21/09/2010.

BAMFORTH, Charles W. **Beer: Tap into the art and science of brewing**. Nova Iorque: Oxford-University Press, 2.ed, 2003. 246 p.

BRIGGS, D.E. et al. **Brewing science and practice**. Nova Iorque: CRC Press, 2004. 863p.

FRANÇOIS, N. et al., (2006). Beer astringency assessed by time-intensity and quantitative descriptive analysis: Influence of pH and accelerated aging. **Food Quality and Preference**, 17 (445-452). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 27/09/2010.

GUYOT-DECLERCK, C. et al., (2005). Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties: A sensory analysis based on AEDA data. **Food Quality and Preference**, 16 (157-162). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 27/09/2010.

IBD - INSTITUTE OF BREWING AND DISTILLING. **Course revision notes for diploma in brewing examination – Module 2 (Yeast and Beer)**. IBD: Londres, 2008.

LEWIS, M. J., BAMFORTH, C. W. **Essays in Brewing Science**. Nova Iorque: Springer, 2006. 179p.

OETTERER, M., REGITANO-D'ARCE, M. A. B., SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 2006. 613p.

SAISON, D. et al., (2009). Contribution of staling compounds to the aged flavours of lager beer by studying their flavour threshold. **Food Chemistry**, 114 (1206-1215). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 22/09/2010.

SANTOS, João Rodrigo da Silva. **Determinação do *trans*-2-nonenal em cerveja por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica**. Dissertação para mestrado em química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 2002. 158p. Arquivo digital cedido pela Biblioteca Central da Universidade do Porto – Portugal.

SENAI - **Apostila curso técnico especial de cervejaria**. Vassouras, 1999. 25p.

SOVRANO, S.; BUIATTI, S.; ANESE, M. (2006). Influence of malt browning degree on lipoxigenase activity. **Food Chemistry**, 99 (711-717).

VENDERHAEGEN, B. et al., (2007). Aging characteristics of different beer types. **Food Chemistry**, 103 (404-412). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

VENDERHAEGEN, B. et al., (2006). The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry**, 95 (357-381). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

4. CONCLUSÃO GERAL

Assim como existe muitos *flavours* desejáveis na cerveja, existe também uma grande variedade de defeitos associados a essa bebida, os *off-flavours*. É de grande importância para a indústria cervejeira que exista um mapeamento desses defeitos, quais compostos estão associados e em quais condições são formados. Esse trabalho teve como objetivo avaliar esses quesitos para um *off-flavour* específico, “papelão”.

Através da revisão bibliográfica foi possível associar esse *off-flavour* com o acetaldeído *trans-2-nonenal*. Pela quantificação do *trans-2-nonenal* em amostras de cerveja concluiu-se que o nível desse composto aumenta com o envelhecimento da cerveja. Através da análise sensorial confirmou-se que o sabor de cerveja oxidada, ou *off-flavour* de “papelão”, está diretamente ligado ao nível de *trans-2-nonenal* presente na bebida. Esse composto parece ser o mais importante para a formação do *off-flavour* de “papelão”, porém, outros compostos podem se formar através de reações de oxidação ou ainda por outras vias e contribuir com o *off-flavour* em questão. Portanto, há muito espaço para novas pesquisas em torno desse defeito sensorial, tanto pelo fato das rotas de formação do *trans-2-nonenal* ainda não estarem bem definidas quanto pela possibilidade de outros compostos transmitirem o *off-flavour* de “papelão” à cerveja.

Além disso, se faz necessário um mapeamento de outros defeitos bastantes críticos em cervejas, tais como: amargor, adstringência, H₂S e lightstruck (defeito provocado por foto-oxidação associado ao odor de gambá) (SANTOS, 2002), que igualmente são bastante impactantes na qualidade sensorial da cerveja.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAMFORTH, C.W. et al., (1999). Enzymic and Non-enzymic oxidation in the brewhouse: a theoretical consideration. **Department of Food Science & Technology**. University of California. Volume 105, n.4 (237-242). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21/09/2010.

BAMFORTH, Charles W. **Beer: Tap into the art and science of brewing**. Nova Iorque: Oxford-University Press, 2.ed, 2003. 246 p.

BRIGGS, D.E. et al. **Brewing science and practice**. Nova Iorque: CRC Press, 2004. 863p.

DEPRAETERE, S.A. et al., (2008). The influence of wort aeration and yeast preoxygenation on beer staling process. **Food Chemistry**, 107 (242-249). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

FRANÇOIS, N. et al., (2006). Beer astringency assessed by time-intensity and quantitative descriptive analysis: Influence of pH and accelerated aging. **Food Quality and Preference**, 17 (445-452). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 27/09/2010.

GONÇALVES, L.M. et al., (2010). Analysis of aldehydes in beer by gas-diffusion microextraction: characterization by high-performance liquid chromatography-diode-array detection- atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217 (3717-3722). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21/09/2010.

GUIDO, L.F. et al., (2004). Simultaneous determination of E-2-nonenal and β -damascenone in beer by reversed-phase liquid chromatography with UV detection. **Journal of Chromatography A**, 1032 (17-22). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

GUYOT-DECLERCK, C. et al., (2005). Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties: A sensory analysis based on AEDA data. **Food Quality and Preference**, 16 (157-162). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 27/09/2010.

IBD - INSTITUTE OF BREWING AND DISTILLING. **Course revision notes for diploma in brewing examination** – Module 2 (Yeast and Beer). IBD: Londres, 2008.

KUNZE, Wolfgang. **Technology brewing & malting**. Berlin: VLB Berlin, 4th ed, 2010. 722p.

LERMUSIEAU, G.; LIÉGEOIS, C.; COLLIN, S. (2001). Reducing power of hop cultivars and beer ageing. **Food Chemistry**, 72 (413-418). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 22/09/2010.

LEWIS, M. J., BAMFORTH, C. W. **Essays in Brewing Science**. Nova Iorque: Springer, 2006. 179p.

NOËL, S. et al., (1999). Release of deuterated nonenal during beer aging from labeled precursors synthesized in the boiling kettle. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (4323-4326). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

OETTERER, M., REGITANO-D'ARCE, M. A. B., SPOTO, M.H.F. **Fundamentos de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Barueri: Manole, 2006. 613p.

SAISON, D. et al., (2009). Contribution of staling compounds to the aged flavours of lager beer by studying their flavour threshold. *Food Chemistry*, 114 (1206-1215). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 22/09/2010.

SANTOS, João Rodrigo da Silva. **Determinação do *trans*-2-nonenal em cerveja por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica**. Dissertação para mestrado em química na Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Porto, 2002. 158p. Arquivo digital cedido pela Biblioteca Central da Universidade do Porto – Portugal.

SANTOS, J.R. et al., (2003). Determination of E-2-nonenal by high-performance liquid chromatography with UV detection. Assay or the evaluation of beer ageing. *Journal of Chromatography A*, 985 (395-402). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

SENAI - **Apostila curso técnico especial de cervejaria**. Vassouras,1999. 25p.

SOVRANO, S.; BUIATTI, S.; ANESE, M. (2006). Influence of malt browning degree on lipoxigenase activity. *Food Chemistry*, 99 (711-717). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

STEPHENSON, W.H. et al., (2003). Laboratory-scale studies of the impact of oxygen on mashing. *Journal of the Institute of Brewing and Distilling*, 109 (273-283). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 22/09/2010.

STEPHENSON, W.H.; BAMFORTH, C.W. (2002). The impact of lightstruck and stale character in beers on their perceived quality: a consumer study. *Journal of the Institute of Brewing and Distilling*, 108 (406-409). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 27/09/2010.

VANDERHAEGEN, B. et al., (2007). Aging characteristics of different beer types. *Food Chemistry*, 103 (404-412). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 21/09/2010.

VANDERHAEGEN, B. et al., (2006). The chemistry of beer aging – a critical review. *Food Chemistry*, 95 (357-381). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 05/09/2010.

VENTURINI FILHO, W. G. **Tecnologia de Cerveja**. Botucatu: Funep, 2000. 84p.

VESELY, P. et al., (2003). Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 51 (6941-6944). Disponível em <www.sciencedirect.com>. Acesso em: 22/09/2010.