

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS MATEMÁTICAS E DA NATUREZA
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**Análise de cervejas por RMN e classificação de seus estilos
por ACP**

Camilla do Nascimento Bernardo

RIO DE JANEIRO

2014

ANÁLISE DE CERVEJAS POR RMN E CLASSIFICAÇÃO DE SEUS ESTILOS POR PCA

Camilla do Nascimento Bernardo

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do diploma de Química com Atribuições Tecnológicas.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Paula F. de Aguiar
Dr. Jochen Junker

Rio de Janeiro

2014

BERNARDO, Camilla do Nascimento

Análise de cervejas por RMN e classificação de seus estilos por PCA/
Camilla do Nascimento Bernardo. - Rio de Janeiro: UFRJ/IQ, 2014.

104 f

Trabalho de Conclusão de Curso – UFRJ/ Instituto de Química – IQ, 2014.

Orientadores: Paula Fernandes de Aguiar e Jochen Junker.

1. Cervejas.

2. Estilos.

3. Análise dos Componentes Principais

4. Ressonância Magnética Nuclear

I. de Aguiar, Paula e Junker, Jochen

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química

III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química

IV. Título

Análise de cervejas por RMN e classificação de seus estilos por PCA

Camilla do Nascimento Bernardo

Orientadores: Paula de Aguiar e Jochen Junker

Projeto final submetido ao corpo docente do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro (IQ/UFRJ), como parte dos requisitos necessários à obtenção do diploma de Químico com Atribuições Tecnológicas.

Aprovada por:

Prof^a. Paula Fernandes de Aguiar, D. Sc (IQ/UFRJ)

Dr. Jochen Junker (FIOCRUZ)

Prof. Emerson Schwingel Ribeiro (IQ/UFRJ)

Prof^a. Queli Aparecida de Almeida Passos (IFRJ)

Rio de Janeiro, 28 de Julho de 2014.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter cuidado de mim e provido tudo que sempre necessitei para que pudesse atingir esta etapa.

Agradeço a minha família, especialmente meu avô e minha mãe, pelo exemplo de pessoas trabalhadoras e honestas, além do apoio dado e confiança que depositaram em mim, financiando assim meus estudos.

Agradeço a todos os professores das escolas e faculdade onde estudei pela paciência e carinho que demonstraram na transmissão de conhecimento dentro e fora de classe. Jamais me esquecerei das aulas fascinantes e claras de Química Orgânica, lecionadas pela professora Mônica Calmon de Aguiar no Colégio Pedro II, que despertaram em mim o interesse pela Química. Agradeço a professora Marciella Scarpellini do IQ/UFRJ pelos conselhos e atenção dados a minha turma na disciplina de Química Geral I no primeiro período da graduação.

Agradeço ao meu orientador Jochen Junker, que sempre me apoiou e confiou em mim, dando-me a oportunidade de exercer parte do conhecimento que adquiri na graduação. Também, agradeço-lhe pela paciência e consideração que sempre teve comigo, especialmente diante da confecção deste trabalho.

Agradeço a minha orientadora Paula Aguiar pela paciência e incentivo que me deu, sendo fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Agradeço à Charles Amaral pelo convívio, pelo apoio, pela compreensão e pela amizade durante o tempo que trabalhamos no laboratório.

Agradeço a Eliane Gonçalves de Carvalho pela paciência, incentivo e por ter me ajudado a confeccionar os experimentos da análise.

Agradeço aos amigos Marcos Jun, Elizete Lima, Juliana Pacheco, Rayane Natasche e Ramon Paschoal pela paciência, preocupação e disponibilidade no empréstimo de materiais necessários para a realização das análises deste trabalho.

Agradeço a farmacêutica Adélia Belem pela total disposição em ajudar-me na tentativa de analisar as cervejas por Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas.

Agradeço as companheiras de laboratório Julyana Machado e Quézia Sant'anna pelos momentos alegres que me proporcionaram tanto dentro como fora do laboratório.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente à Juliana Meneguete, Karina Rodrigues, Marllon Nascimento, Michelle Pêgas, Vlademir Figueiredo, Lincoln Tassi, Monique Félix, Samara Amorim, Izabela Morgado, Gabriela de Assis e Carolina de Assis que me deram conselhos na maioria dos momentos e alegraram-me nos outros, para que eu pudesse concluir esta etapa.

RESUMO

PROJETO DE CURSO

TÍTULO: Análise de cervejas por RMN e classificação de seus estilos por PCA.

ALUNO: Camilla do Nascimento Bernardo

ORIENTADORES: Paula Fernandes de Aguiar , DQA – Instituto de Química – UFRJ
Jochen Junker, CDTS – FIOCRUZ.

A cerveja é uma das bebidas mais consumidas no mundo. Existem vários tipos e estilos de cerveja, satisfazendo a praticamente todos os gostos do consumidor. Ela é uma bebida com características próprias que dependem do tipo de matéria-prima utilizada e das condições do processo de produção, como o tipo de fermentação. Como qualquer outro produto, ela necessita passar por um controle de qualidade antes de ser distribuída. Este controle exige uma série de análises químicas e microbiológicas. Também, como qualquer outro produto, é passível de adulterações. Por isso, a discriminação dos tipos e estilos de cerveja é importante para evitar fraudes e garantir o produto entregue ao consumidor. Embora haja na literatura alguns trabalhos que permitam fazer a distinção entre os tipos de cerveja, não há nenhum que permita fazer a diferenciação entre seus estilos. Assim, neste trabalho a Análise por Componentes Principais (PCA do inglês “*Principal Components Analysis*”) foi aplicada aos resultados de análises da técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), de forma a avaliar se esta técnica Quimiométrica é capaz de fazer a diferenciação dos estilos de cerveja. O estudo baseou-se na análise de 30 cervejas, pertencentes a sete diferentes estilos- German Pilsen (GP), Kölsch (K), Pilsen, Pale Ale, Premiun American Lager (PAL) Standard American Lager (SAL) e Rauch Bier. Também, foram criados modelos de classificação dos estilos de cervejas e verificou-se que os modelos foram eficientes na identificação de alguns estilos. Os modelos de classificação na faixa dos alifáticos e açúcares, respectivamente, Alifáticos e Aromáticos não classificaram as cervejas corretamente. Isto pode ser explicado pelo tipo de fermentação que as cervejas usadas no teste de validação apresentam, fermentação tipo *lager*, exceto a cervejas do estilo Kölsch. As cervejas do estilo PAL, Amstel e Mahou, foram corretamente classificadas pelo modelo na faixa dos aromáticos- modelo Aromáticos I. Enquanto que as cervejas Antartica sub-zero, Skol, Brahma e Skol International, todas pertencentes ao estilo SAL, não foram corretamente classificadas pelo mesmo modelo. Isto pode aferir diferenças na composição das cervejas quanto ao teor de lúpulo. Isto permite dizer que, com alguma cautela, é possível discriminar os estilos de cerveja usando esta técnica Quimiométrica. E ainda aferir o tipo de fermentação e o teor de lúpulo da cerveja pela classificação do modelo. Os resultados permitem pensar no uso de ACP e RMN como estratégia de controle de qualidade de cervejas, além de seu potencial uso forense.

Lista de figuras

Figura 1: Estrutura molecular dos isômeros α e β dos monossacarídeos. Figura adaptada de FERREIRA, 2011, p. 4-7.	26
Figura 2: Estrutura molecular dos dissacarídeos: sacarose, α -maltose e β -lactose. Figura adaptada de FERREIRA, 2011, p. 7-9.	27
Figura 3: Níveis de energia do spin em campo magnético B_0 . N é a população de spins acima (N_α) e abaixo (N_β). A força de B_0 aumenta para a direita. Figura adaptada do ATKINS, 2006. p. 128.	37
Figura 4: Aplicação da Transformada de Fourier para aquisição de espectro de RMN. Os espectros com domínios de tempo resultam em espectros com domínio de frequência e respectivos deslocamentos químicos após a Transformada de Fourier (TF) computadorizada. Figura adaptada do FREITAS, 2009.	39
Figura 5: Representação de uma matriz de dados com m variáveis e n amostras. Figura adaptada do MASSART, 1997. p. 520	40
Figura 6: Projeção dos pontos em CP1 para o conjunto de dados. Figura adaptada do MASSART, 1997. p. 526.	42
Figura 7: O plano PC1-PC2. Projeções neste plano produziriam uma boa representação dos dados originais. Figura adaptada do MASSART, 1997. p. 526.	42
Figura 8: As sub-regiões A, B, C, D e E mostram respectivamente: grau de confiabilidade do modelo; distância das amostras em relação ao modelo; curva da variância explicada; gráfico de <i>scores</i> e <i>loadings</i> obtidos com os espectros de RMN na faixa dos alifáticos. Em roxo estão marcadas as cervejas do estilo PAL: Becks e Heineken.	43
Figura 9: Expansão do espectro de RMN de ^1H 1D da cerveja no qual alguns compostos químicos estão assinalados.	Erro! Indicador não definido.
Figura 10: Espectro de ^1H -DOSY da cerveja Itaipava. Os eixos, horizontal F2 e vertical F1, representam, respectivamente, os deslocamentos químicos e os coeficientes de difusão moleculares.	49
Figura 11: Espectro de DOSY ampliado da cerveja Itaipava.	50
Figura 12: Espectros de RMN de diferentes estilos de cerveja na faixa dos alifáticos.	52
Figura 13: Espectros de RMN de diferentes estilos de cerveja na faixa dos açúcares.	53
Figura 14: Espectros de RMN de diferentes estilos de cerveja na faixa dos aromáticos.	54

Figura 15: Gráfico da ACP na faixa dos alifáticos. Em amarelo está representada a cerveja do estilo Rauch Bier (Eisenbenh Rauch Bier). Em azul está representada a cerveja do estilo SAL (Brahma). Em roxo estão indicadas as cervejas do estilo PAL (Heineken e Stella Artois). Em verde está indicada a cerveja do estilo Pilsen (Eisenbahn Pilsen). Em laranja estão representadas as cervejas do estilo GP (Warsteiner, König e Bitburger). Em marrom está indicada a cerveja do estilo Kölsch (Eisenbahn Kölsch).56

Figura 16: Gráfico de ACP na região dos açúcares. Em azul estão indicadas as cervejas do estilo SAL: Antactica, Antarctica sub-zero e Kaiser. Em cinza está indicada a cerveja do estilo Pale Ale: Eisenbahn Pale Ale. Em laranja estão representadas as cervejas do estilo GP: König e DAB. Em roxo estão representadas as cervejas do estilo PAL: Duff Beer e Stella Artois.57

Figura 17: Gráfico de ACP na região dos açúcares. Em azul estão indicadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica e Skol. Em laranja estão representadas as cervejas do estilo GP: DAB, Fürsten e Werner. Em marrom está indicada a cerveja do estilo Kölsch: Eisenbahn Kölsch. Em cinza está representada a cerveja do estilo Pale Ale: Eisenbahn Pale Ale.58

Figura 18: Gráfico de ACP na região dos aromáticos. Em azul estão representadas as cervejas do estilo SAL: Devassa, Schin, Kaiser e Antarctica. Em roxo estão representadas as cervejas do estilo PAL: Becks, Duff Beer, Heineken e Stella Artois.60

Figura 19: Gráfico de ACP na região dos aromáticos. Em azul estão representadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica, Devassa, Kaiser e Schin. Em cinza está representada a cerveja do estilo Pale Ale: Eisenbahn Pale Ale. Em marrom está representada a cerveja do estilo Kölsch: Gaffel. Em laranja estão representadas as cervejas do estilo GP: König e Werner.....61

Figura 20: Gráfico da ACP na região dos aromáticos. Em azul estão indicadas as cervejas do estilo SAL: Schin, Budweiser, Brahma e Devassa. Em marro estão representadas as cervejas do estilo Kölsch: Gaffel e Eisenbahn Kölsch. Em laranja estão indicadas as cervejas do estilo GP: Bitburger, DAB e Fürsten. Em roxo estão representadas as cervejas do estilo PAL: Duff Beer.....62

Figura 21: Gráfico da ACP na região dos aromáticos. Em laranja estão indicadas as cervejas do estilo GP: Bitburger, Werner e König. Em azul estão apresentadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica, Kaiser, Schin e Devassa. Em marrom está representada a cerveja do estilo Kölsch: Eisenbahn Kölsch. Em amarelo está indicada a cerveja do estilo Rauch Bier: Eisenbahn Rauch Bier.63

Figura 22: Gráfico da ACP na região dos aromáticos. Em laranja estão indicadas as cervejas do estilo GP: König e Bitburger. Em azul estão representadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica, Schin, Brahma e Kaiser. Em roxo estão indicadas as cervejas do estilo PAL: Duff Beer e Becks.	64
Figura 23: Aplicação do modelo da ACP na região dos alifáticos às cervejas do estilo SAL– Quilmes, Pilsner-Bohemia e Kölsch- Gäffel. Todas as cervejas as quais o modelo foi aplicado estão representadas em preto.	67
Figura 24: Aplicação do modelo da ACP na região dos alifáticos para as cervejas do estilo GP- DAB, Fürsten e Werner- representadas em preto.	68
Figura 25: Aplicação do modelo de ACP na região dos açúcares para as cervejas do estilo GP e ALE- todas representadas em preto.	69
Figura 26: Aplicação do modelo da ACP na região dos açúcares para as cervejas do estilo GP- Werner, Bitburger e Fürsten - todas representadas em preto.	70
Figura 28: Aplicação do modelo da ACP na região dos aromáticos (modelo Aromáticos I) para as cervejas do estilo PAL- Amstel e Mahou, todas representadas em preto.	71
Figura 29: Aplicação do modelo da ACP na região dos aromáticos (modelo Aromáticos I) para as cervejas do estilo SAL: Antarctica sub-zero, Skol, Brahma e Skol International, todas representadas em preto.	72
Figura 30: Aplicação do modelo de ACP na região dos aromáticos (modelo Aromáticos II) para as cervejas Quilmes- estilo SAL, Colorado- estilo Pale Ale e Eisenbahn Kölsch- Kölsch, todas representadas em preto.	74

Lista de tabelas

Tabela 1: Teor de extrato primitivo de cada tipo cerveja.	23
Tabela 2: Classificação de cerveja segundo a quantidade de álcool.	23
Tabela 3: Composição do grão da cevada e grão do malte.	28
Tabela 4: Composição química do lúpulo e porcentagem de cada componente.	29
Tabela 5: Atuação das enzimas em condições ótimas de pH e temperatura.	31
Tabela 6: Propriedades dos nucléos.	36
Tabela 7: Estilo e característica das cervejas analisadas.	45
Tabela 8: Resultado da validação do modelo de ACP na região dos alifáticos.	68
Tabela 9: Resultado da aplicação do modelo da ACP na região dos açúcares.	70
Tabela 10: Resultado da aplicação do modelo da ACP na região dos aromáticos: modelo Aromáticos I.	73
Tabela 11: Resultado da aplicação do modelo de ACP Aromáticos II.	74

Lista de siglas

ADP- Adenosina difosfato

ACP- Análise por Componentes Principais (PCA do inglês *Principal Component Analysis*)

ATP – Adenosina trifosfato

BJCP - *Beer Judge Certification Program*

BP- Bohemia Pilsner

CAP- Classic American Pilsner

CP- Componente Principal

d = dubleto

DLI- Decaimento Livre por Indução (FID do inglês *Free Induction Decay*)

DOSY- Espectroscopia Ordenada por Difusão

DSS- 4,4-Dimetil 4-Silopentano 1-Sulfônico

EBC – *European Brewers Convention*

EM- Espectrômetro de Massas

GP- German Pilsen

K- Kölsch

LAL- Lite American Lager

m = múltiplo

PAL- Premium American Lager

Pi – fosfato inorgânico

q = quintuplo

QNP- Quattro Nucleus Probe

RDC- Resolução de Diretoria Colegiada

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

s = singleto

SAL- Standard American Lager

t = tripleto

TF – Transformada de Fourier (FT do inglês *Fourier Transform*)

TUB- Termo de Unidade de Turbidez

Sumário

RESUMO.....	7
Lista de figuras	8
Lista de tabelas	11
Lista de siglas	12
Sumário.....	14
Capítulo 1: Introdução	17
Capítulo 2: Objetivo	19
Capítulo 3: Fundamentação teórica	20
3.1 <i>A Cerveja</i>	20
3.1.1 <i>História</i>	20
3.1.2 <i>Tipos e estilos de cerveja</i>	22
3.1.3 <i>Componentes da cerveja</i>	25
3.1.4 <i>Matérias-primas</i>	27
3.1.5 <i>Elaboração da cerveja</i>	30
3.1.5.1 <i>Preparo do mosto</i>	30
3.1.5.2 <i>Transformação do mosto em cerveja</i>	32
3.2 <i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	35
3.2.1 <i>Fundamentos da RMN</i>	35
3.2.2 <i>Aquisição do espectro</i>	38
3.3 <i>Análise por Componentes Principais (ACP)</i>	39
Capítulo 4: Materiais e métodos	45
4.1 <i>Materiais e reagentes</i>	45
4.2 <i>Equipamentos</i>	45

4.3 Seleção das amostras.....	45
4.4 Preparo das amostras	46
4.5 Análise por RMN	46
4.6 Análise dos Componentes Principais	47
4.7 Construção do modelo de ACP através de espectros de RMN.....	47
Capítulo 5: Resultados e Discussão	48
5.1 Características da composição da cerveja por RMN	Erro! Indicador não
definido.	
5.2 Análise da cerveja por ¹ H-DOSY	48
5.3 Análise por Componentes Principais (ACP) dos espectros de RMN	54
5.4 Aplicação do modelo da ACP obtido através dos espectros de RMN.....	66
5.4.2 ACP na região dos açúcares	69
Capítulo 6: Conclusão.....	77
Referências Bibliográficas.....	79
Anexo A - Tabela com deslocamentos químicos.....	84
APÊNDICE A - Espectros de RMN.....	86
APÊNDICE B - Deslocamentos químicos nos pontos dos <i>loadings</i> no CP1 x CP2 da sub-região E no gráfico de ACP.....	101
APÊNDICE C - Deslocamentos químicos nos pontos dos <i>loadings</i> no CP1 x CP3 e CP4 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP	101
APÊNDICE D - Deslocamentos químicos nos pontos dos <i>loadings</i> no CP4 x CP2 da sub-região E no gráfico de ACP	102
APÊNDICE E – Deslocamentos químicos nos pontos dos <i>loadings</i> no CP4 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP	102
APÊNDICE F - Deslocamentos químicos nos pontos dos <i>loadings</i> no CP1 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP	102
APÊNDICE G - Deslocamentos químicos nos pontos dos <i>loadings</i> no CP1 x CP3 e CP2 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP	103

APÊNDICE H - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP1 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP 103

APÊNDICE I - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP2 x CP1 e CP2 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP 104

Capítulo 1: Introdução

A cerveja é uma das bebidas mais antigas de que se tem conhecimento. As primeiras surgiram há sete mil anos atrás na região do Iraque, no Período Neolítico, onde viviam as primeiras civilizações. Ela continua sendo muito apreciada até hoje. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de cerveja, ficando atrás da China e Estados Unidos. De acordo com a Associação Brasileira de Indústria da Cerveja, a produção nacional é de cerca de 13 bilhões de litro por ano (BRASIL é o 3º maior produtor de cerveja do mundo; veja como se faz a bebida, 2013).

Cada região do planeta possui seu jeito particular de produzir cerveja, de acordo com a disponibilidade de matéria-prima. Isto permite que cada cerveja possua características próprias que dependam do tipo de malte, lúpulo, leveduras, condições de armazenamento, entre outros. A legislação brasileira regulamenta a fabricação de cerveja no Brasil e classifica as cervejas levando em consideração os seguintes critérios: extrato primitivo, cor, teor alcoólico, proporção de malte da cevada e fermentação. O artigo 67 da lei número 8.918 que regulamenta a padronização, classificação, registro, inspeção, produção e fiscalização de bebidas expõe:

De acordo com o seu tipo, a cerveja poderá ser denominada: "Pilsen", "Export", "Lager", "Dortmunder", "München", "Bock", "Malzbier", "Ale", "Stout", "Porter", "Weissbier", "Alt" e outras denominações internacionalmente reconhecidas que vierem a ser criadas, observadas as características do produto original (CONSTITUIÇÃO. 1988).

O controle de qualidade é imprescindível na fabricação das cervejas. Durante este controle, várias análises são necessárias, principalmente a microbiológica. São realizados ensaios químicos que avaliam o teor alcoólico, quantificação do diacetil, análise de pH, amargor, entre outros (MINICURSOS CRQ-IV A cerveja e seus segredos: Controle de qualidade, 2010). Alguns estudos referentes à diferenciação dos diversos tipos de cerveja já são encontrados na literatura. Cientistas classificaram (COLUNISTA de AZoM.com, 2013) diferentes tipos de bebidas usando medidas espectroscópicas e análise multivariada. Eles obtiveram espectros de absorvância de diferentes tipos de cerveja (comuns com pouco malte) e de cervejas não-alcoólicas, classificando-as em grupos usando a Análise por Componentes Principais (ACP), do inglês *Principals Components Analysis*. Khatib e colaboradores (2006) aplicaram a técnica espectroscópica- Ressonância Magnética Nuclear (RMN) em cervejas do

tipo Pilsen, seguido de análise multivariada com ACP a fim de identificar os compostos responsáveis pela diferença entre elas. Outros pesquisadores (DUARTE et al, 2002) usaram a RMN de alta resolução e análise multivariada para classificar cervejas de acordo com seu tipo, *ale* e *lager*, obtendo ótima separação entre estes tipos na região de deslocamento químico dos aromáticos. Em 2003, estes mesmos pesquisadores (DUARTE et al, 2003) identificaram os carboidratos presentes nas cervejas, *ale* e *lager*, analisando as cervejas por meio das técnicas de Cromatografia Líquida acoplada à RMN e os compostos foram identificados pela Espectrometria de Massas (CL-RMN/EM). Rodrigues e colaboradores (2011) acompanharam a deterioração térmica da cerveja através da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), apontando os compostos específicos de relevância neste processo de deterioração.

Muitos estudos, a fim de identificar as substâncias químicas presentes na cerveja e diferenciar os tipos da mesma, já foram realizados. Entretanto, sabe-se que dentro de cada conjunto de tipos de cerveja, existem diversos estilos de cerveja. Sabe-se que embora algumas cervejas pertençam ao mesmo tipo, elas são bem diferentes em relação ao sabor dependendo do estilo as quais pertencem. Além disso, já se tem notícias de adulteração de rótulos de cervejas aqui no Brasil (SOARES, 2013; PASSOS, 2014). Sendo assim, a diferenciação dos estilos das cervejas por RMN poderá ser usada no controle de qualidade das mesmas. O presente trabalho utiliza Análise por Componentes Principais, aliada a espectros de Ressonância Nuclear Magnética de próton para tentar diferenciar os diferentes estilos de cerveja.

Capítulo 2: Objetivo

O objetivo deste projeto consiste na aplicação da técnica de Quimiometria denominada Análise por Componentes Principais (ACP) nos espectros de deslocamento químico de próton de Ressonância Nuclear Magnética (RMN), na discriminação dos diferentes estilos de cervejas. E também, propõe-se a criação de modelos de ACP a fim de se classificar os estilos de cervejas.

Capítulo 3: Fundamentação teórica

Este capítulo exhibe os principais conceitos teóricos necessários ao desenvolvimento deste trabalho.

3.1 A Cerveja

A cerveja é uma bebida fermentada, cujos principais componentes (ingredientes) são água, malte, lúpulo e levedura. Adjuntos aromáticos como frutas e ervas podem ser adicionados à bebida para intensificar seu paladar. Keukeleire definiu cerveja como um extrato de malte de cevada, fervido, lupulado, resfriado e fermentado, contendo álcool, gás carbônico e açúcares (2000).

3.1.1 História

A cerveja é uma das mais antigas criações do homem. Babilônios e sumérios fabricavam e degustavam a cerveja desde 6000 a.C.. Devido aos efeitos alcoólicos, por exemplo, a alteração de consciência, a bebida era ligada à fertilidade, festanças e cultos religiosos. A cerveja surgiu em várias épocas distintas pelo planeta. Cada região fabricava a cerveja da sua forma segundo as matérias-primas locais disponíveis (BELTRAMINI, 2012).

No Egito, por volta de 3100 a 2700 a.C., a cerveja já estava entre a base alimentar da população. Com o tempo, os egípcios aperfeiçoaram suas técnicas cervejeiras e passaram a produzir cerveja com uma variável ancestral do trigo chamada *emmer*. Daí em diante, surgiram vários estilos de cerveja, aromatizadas com ervas, mel, raízes e frutas. A dificuldade de acesso à água potável e ao saneamento básico perdurou durante a Idade Média, de modo que mosteiros europeus passaram a produzir vinho e cerveja, que eram mais saudáveis que a água. Nos mosteiros medievais, a cerveja servia tanto para consumo próprio, como para acabar com a fome dos peregrinos. A cerveja era consumida especialmente nos jejuns, que não era quebrado com o simples consumo de líquidos. As receitas cervejeiras eram transmitidas de monges para monges através de gerações religiosas durante a Idade Média (CERVEJAS..., 2014).

O *gruit*- mistura de ervas contendo cominho, gengibre, noz-moscada, canela, alecrim, lúpulo, entre outros, era o responsável pelo aroma e sabor da cerveja antes do uso extensivo do lúpulo. Hildegarda von Bingen (1098 -1179), conhecida como teóloga, naturalista, médica, entre outras habilidades, trouxe à luz o conhecimento do lúpulo aplicado à cerveja. Ela

afirmava que o lúpulo era uma planta útil como conservante para bebidas e eficaz para a saúde física, devido a seus efeitos calmantes. Assim, os príncipes das chamadas “cidades-Estado” germânicas promoveram o uso do lúpulo como aromatizante na cerveja como saída aos exorbitantes tributos cobrados pela Igreja sobre o comércio do *gruit*. Além disso, estudos confirmaram que a cerveja podia ser conservada por mais tempo se fosse adicionado lúpulo em sua elaboração, o que não ocorria com o *gruit* (A História do Gruit, 2013).

Até o século XVI o homem não tinha conhecimento do processo de fermentação e, por isso, as cervejas existentes em todo o planeta pertenciam à família *ale*. A fermentação era natural. As leveduras presentes na atmosfera entravam em contato com o açúcar do mosto, produzindo o álcool e gás carbônico (BELTRAMINI, 2012). Em temperaturas altas, as leveduras do ar multiplicam-se em um ritmo maior, de forma que os cervejeiros da época, que não sabiam como lidar com este problema, deparavam-se com o espectro da inconstância da qualidade das cervejas. Com o objetivo de minimizar este problema, em 1553, o duque Albrecht V da Baviera decretou que toda cerveja deveria ser produzida nas estações de outono e inverno europeus, podendo ser guardadas para consumo durante a primavera e o verão. Como na época a refrigeração mecânica ainda não havia sido inventada, os cervejeiros alemães buscavam um local de estoque onde as cervejas pudessem ser armazenadas refrigeradas a fim de não azedarem. Felizmente, alguém lembrou que as cavernas nas encostas dos Alpes permaneciam geladas durante todo o ano, inclusive nos meses quentes. As cervejas passaram a serem armazenadas lá e observou-se que, a baixas temperaturas, os fermentos acumulavam-se no fundo dos tonéis, originando-se daí o termo em inglês *bottom fermented*, ou fermentação de fundo, relacionado a cervejas *lager* e mal traduzido em português para “baixa fermentação”. O termo *lager* provém da palavra alemã *lagern*, que significa guardada, armazenada. Diferentemente das cervejas *ale* (escuras e opacas), as cervejas *lager* são claras e transparentes (RAMÍREZ. 2003; HISTÓRIA da cerveja: Um pouco de História da Cerveja. 2013; A LEI da Pureza Alemã 2011).

A cerveja *lager* disseminou-se no planeta por causa de seu maior tempo de armazenamento, o que permitiu seu transporte para regiões mais longínquas e facilitou seu comércio. Bioquímicos esclareceram que ocorreu a mutação genética ou seleção natural das leveduras *ale*, até então utilizadas no processo de fabrico de cervejas, dando origem à nova cepa que fermentava melhor em temperaturas baixas. Sendo assim, os diferentes estilos de cerveja foram surgindo espontaneamente no mundo ao longo da história, sendo vários os

parâmetros predefinidos que separam os estilos, como tipo de fermentação, ingredientes, aparência, aroma, sabor, paladar, teor de álcool, amargor, etc (CERVEJAS mundo: As Lager, 2013; CERVEJAS do mundo: As Ale, 2013).

3.1.2 Tipos e estilos de cerveja

As cervejas são classificadas de acordo com algumas características do produto e tipo de processo utilizado na sua fabricação. Os principais aspectos levados em consideração para a classificação de cerveja são a natureza e as características das matérias-primas usadas, tipo de levedura e condição do processo, que influenciam diretamente no tipo de cerveja a ser obtida. Os tipos de cervejas estão relacionados com conteúdo alcoólico, tipo de fermentação, concentração do malte e lúpulo utilizados, duração do envelhecimento, teor de extrato final e extrato primitivo (TIPOS de Cerveja, 2014).

Quanto ao tipo de fermentação, as cervejas podem ser de alta ou baixa fermentação. As cervejas de alta fermentação, conhecidas como *ale*, são as cervejas mais antigas, nas quais as leveduras fermentam com temperaturas entre 18 e 22 °C. Estas cervejas são obtidas pela ação do lêvedo que emerge para a superfície durante a vigorosa fermentação. Já as cervejas de baixa fermentação, conhecidas como *lager*, são produzidas por leveduras que floculam no final da fermentação primária (ou principal). Estas cervejas são obtidas pela fermentação do lêvedo que se deposita no fundo do tanque, durante ou após a fermentação, sendo este o tipo de cerveja mais popular do mundo. A temperatura de fermentação destas cervejas ocorre entre 8 e 14 °C. As cervejas do tipo *ale* são mais encorpadas e saborosas e servidas em temperaturas mais elevadas do que as cervejas do tipo *lager*. No Brasil, 75% das cervejas vendidas pertencem ao estilo *lager* e estas representam 90% do total de vendas (SILVA, 2014).

A cerveja também pode ser classificada pelo teor de extrato primitivo. O teor de extrato primitivo é a densidade original do mosto antes de ser fermentado. A tabela 1 apresenta o teor de extrato de primitivo para diferentes tipos de cerveja.

Tabela 1: Teor de extrato primitivo de cada tipo cerveja.

Tipo de cerveja	Teor de extrato primitivo (% p/p)
leve	5 - 10,5
comum	10,5 - 12
extra	12 - 14
forte	acima de 14

Fonte: SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2013.

A cerveja também pode ser classificada segundo a cor. Esta classificação é feita em E.B.C (European Brewerz Convention). A cerveja clara deve conter menos de 20 unidades E.B.C. e a cerveja escura 20 ou mais unidades de E.B.C. (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA, 2013).

A classificação quanto ao teor alcoólico expressa a porcentagem de álcool na cerveja. A tabela 2 mostra a classificação de cada tipo de cerveja conforme a quantidade de álcool:

Tabela 2: Classificação de cerveja segundo a quantidade de álcool.

Tipo de cerveja	álcool (%p/v)
sem álcool	< 0,5
baixo teor alcoólico	0,5 - 2,0
médio teor alcoólico	2,0 - 4,5
alto teor alcoólico	4,5 - 7,0

Fonte: SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. 2013.

Estima-se que atualmente existam 20 mil marcas e 150 tipos de cervejas no mundo inteiro. Os diferentes estilos de cerveja foram surgindo espontaneamente no mundo ao longo da história, sendo vários os parâmetros predefinidos que separam os estilos, como o tipo de fermentação, os ingredientes, a aparência, o aroma, o sabor, o paladar, o teor de álcool, o amargor, etc. O nome dos estilos das cervejas pertencentes ao tipo *lager* homenageia as cidades onde foram criadas estas cervejas, como, por exemplo, Pilsner, Munchener, Viena, Dortmund, Einbeck, Bock, Export e Munich. Estas cervejas são armazenadas em baixa temperatura e são guardadas até meses, dependendo da cervejaria, para clarear e amadurecer. A grande quantidade destas cervejas tem cor clara e sabor moderadamente amargo (SILVA, 2014).

As cervejas *lager* tipo Pilsen originaram-se na República Tcheca em 1842, quando os produtores buscavam um estilo de cerveja cuja coloração fosse mais límpida e transparente. Os ingredientes característicos da cerveja Pilsen são malte de cevada levemente seco, lúpulo picante, levedura, água e uma fermentação tipo *lager* em temperaturas entre 13 e 14 °C, durante três semanas.

O tipo *pilsen* divide-se em três estilos: German Pilsner (GP), Bohemia Pilsner (BP) e Classic American Pilsner (CAP). O estilo clássico GP é fabricado com lúpulos nobres alemães como Saaz, Harrlletauer Mittelfür, Tettnanger, Estíria Goldings, Spalt, Perle, entre outros, sendo as cervejas bem lupuladas, com sabor e aroma picantes e o amargor do lúpulo bem elevado (SILVA, 2014; BEER Glossary, 2014).

O refrescante estilo BP é feito com maltes canadenses e europeus e lúpulo da variedade *Saaz*. É conhecida pela doçura do malte e um final amargo refrescante (BOHEMIAN Style Pilsener, 2013) A CAP foi criada antes da Lei Seca norte-americana e possui maior teor de lúpulo (BELTRAMINI, 2012). As cervejas *lager* tipo suave conquistaram o mundo após a Revolução Industrial e foram elaboradas para refrescar e custar barato, uma vez que são preparadas com insumos como arroz e milho. Elas são as cervejas mais vendidas e consumidas em todo o mundo. Este tipo agrupa cinco estilos de cerveja: *Lite American Lager* (LAL), *Standard American Lager* (SAL), *Premium American Lager* (PAL), *Munich Helles*, *Dortmunder Export*. As cervejas do estilo LAL têm coloração amarela pálida e são suaves devido à presença de traços de malte e lúpulo, tendo um sabor levemente doce.

O estilo SAL é bem similar ao estilo LAL com um teor alcoólico maior, suave aroma de malte e baixíssimo amargor.

O estilo PAL possui maior percepção de lúpulo em relação aos últimos estilos, além da alta carbonatação.

As cervejas Premium são conhecidas por sua cor clara. A quantidade de adjunto de arroz e milho adicionado nas cervejas Premium é menor do que nos outros estilos mencionados anteriormente do tipo *lager* suave (2008 BJCP Style Guidelines: Category 1-Light Lager, 2014).

O estilo Rauch Bier cujas cervejas são escuras e de baixa fermentação, pertence ao grupo de cervejas amadeiradas. *Rauch* significa fumaça em alemão e a cerveja tem este nome

por ser produzida a partir de maltes defumados. Os maltes são secos em fogo gerado pela queima da madeira. Com a invenção de secadores cujo combustível passou a ser o carvão, em meados de 1700, esse caráter defumado foi perdido na maioria das cervejas. As cervejas apresentam aroma e sabor com notas defumadas que lembram madeira, fumaça e bacon, malte tostado e lúpulo moderado (EISENBAHN Hauch Bier, 2013).

As cervejas híbridas possuem esse nome porque são feitas com fermento *ale* e maturadas em temperatura mais característica de *lager*. O estilo Kölsch, cujas cervejas são claras, secas e com sabor de uma *ale* e levemente amarga, originou-se na cidade alemã de Colônia. As cervejas com este estilo são delicadas e refrescantes, com um leve sabor frutado e discreto amargor de lúpulo. Como um estilo de cerveja alemã, o Kölsch é fabricado de acordo com a lei da Pureza Alemã, na qual somente cevada, lúpulo, água e levedura são usados (O que é Reinheitsgebot, 2013). As temperaturas frias dão ao estilo uma qualidade seca, enquanto que o fermento *ale* contribui com algum sabor frutado e de pão - como aromas e sabores que não são normalmente encontrados em *lager* (KÖLSCH Profile, 2014).

3.1.3 Componentes da cerveja

A cerveja possui mais de 800 compostos que contribuem para seu aroma, amargor, doçura, sabor lupulado e alcoólico. Diversas classes de substâncias, como carboidratos, alcoóis, aminoácidos, compostos fenólicos, vitaminas, ácidos carboxílicos, proteínas, entre outros, foram encontrados nas cervejas através de análises químicas. As proteínas da cerveja são provenientes do malte da cevada (RAMÍREZ, 2003). Modificações químicas que ocorrem nas proteínas durante a fermentação originam alguns polipeptídeos encontrados nas cervejas.

Cervejas contêm pequenas quantidades de vitaminas, como biotina e vitaminas do complexo B (ou niacina), como a vitamina B1 (ou tiamina), B2 (ou riboflavina), B4 (ou adenina), B5 (ou ácido pantotênico), B6 (ou pirrodoxina, mesoinositol), B12 (ou cianocobalamina), que são importantes para o crescimento da levedura durante a fermentação, especialmente a biotina, o inositol e o ácido pantotênico. Sendo assim, o mosto (mistura do malte moído com água quente e rico em açúcares) é uma rica fonte de vitaminas. Exceto o inositol, que possui papel estrutural, todas as vitaminas têm função catalítica (BANFORTH, 2000).

A quantidade de açúcares, carboidratos e dextrinas variam de acordo com o tipo de cerveja. As cervejas tipo *lager* são normalmente mais fermentadas que as tipo *ale* e contêm

menos carboidratos residuais. A fonte de açúcares fermentáveis na cerveja é o amido, rico em cereais, principalmente o malte da cevada. Os sacarídeos, que mantêm a cerveja após a fermentação, incluem monossacarídeos (D-ribose, L-arabinose, D-xylose, e D-galactose encontrada em quantidades traços), D-glicose e D-frutose, que são os principais monossacarídeos no mosto; os dissacarídeos essenciais são maltose (14% do carboidrato total do mosto) e sucrose (5% do carboidrato total do mosto). Dos trissacarídeos, o principal açúcar é a maltotriose, que corresponde a quase 14% dos carboidratos totais.

Grande quantidade de trissacarídeos (96%) é produzida na mosturação (etapa na qual o malte é misturado a água e cozido) (RAMÍREZ, 2003). Açúcares podem servir como indicadores da autenticidade e adulteração de bebidas, como sucos, uísques e cachaça, além do acompanhamento do envelhecimento da mesma. As figuras 1 e 2 mostram a estrutura de alguns carboidratos, monossacarídeos e dissacarídeos, respectivamente.

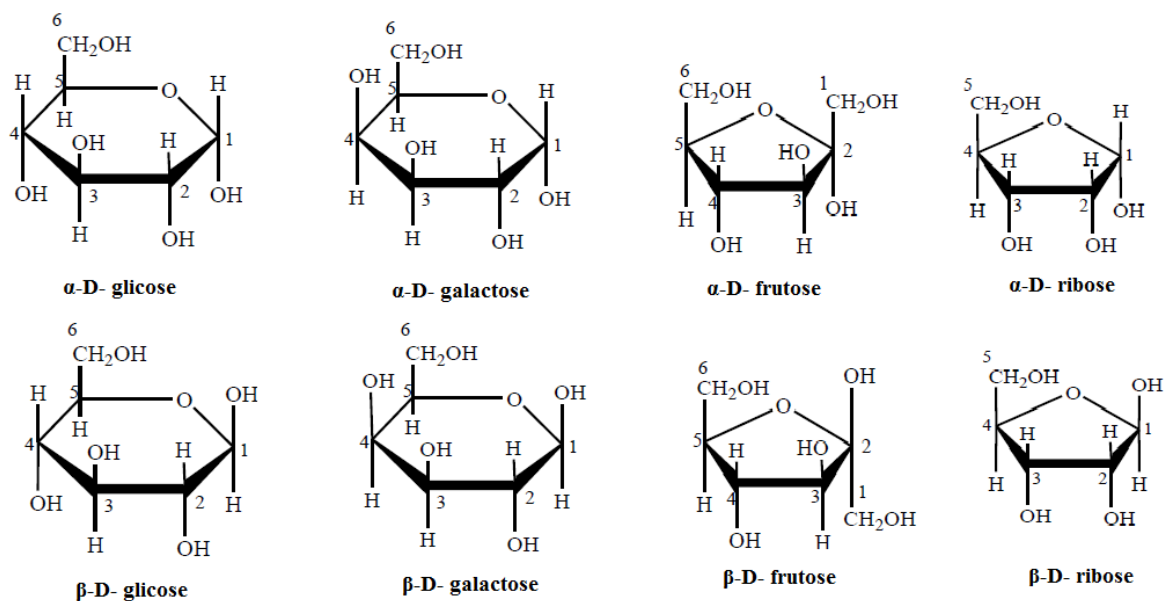


Figura 1: Estrutura molecular dos isômeros α e β dos monossacarídeos. Figura adaptada de FERREIRA, 2011, p. 4-7.

Na figura 1, observam-se as duas estruturas cíclicas da glicose, isômeros chamados de α e β -D-glicose. No isômero α o grupo hidroxila no C-1 está abaixo do anel, e no isômero β no C-1 o grupo hidroxila encontra-se em cima do anel. A galactose difere da glicose na configuração do carbono C-4. O mesmo ocorre com a galactose. Assim como a glicose, os isômeros da galactose dependem da posição do grupo hidroxilo no carbono C-1 do anel. Os isômeros α e β diferem entre si pela configuração que apresentam à volta do carbono C-2.

Semelhantemente, os isômeros cíclicos da ribose diferem entre si pela posição do grupo hidroxila em relação ao carbono C-1 do anel (FERREIRA, 2011).

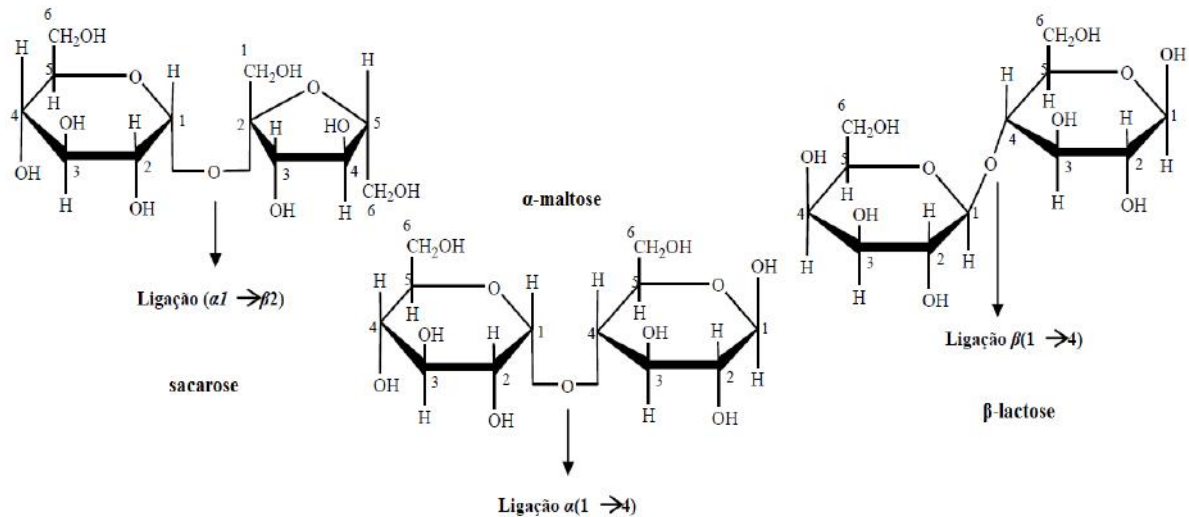


Figura 2: Estrutura molecular dos dissacarídeos: sacarose, α -maltose e β -lactose. Figura adaptada de FERREIRA, 2011, p. 7-9.

Os dissacarídeos são constituídos por duas unidades de monossacarídeos, unidos por uma ligação glicosídica. Esta ligação é formada pela reação entre o grupo hidroxila do primeiro monossacarídeo e outro grupo hidroxila do segundo monossacarídeo. Por hidrólise, a molécula de dissacarídeo produz duas moléculas de monossacarídeos (FERREIRA, 2011).

3.1.4 Matérias-primas

- Água

A água é um fator de grande relevância no preparo da cerveja, já que a água para produção deve possuir características específicas. Em termos gerais, a água para produção de cerveja, conhecida como “água cervejeira”, deve ser insípida, inodora, possuir pH entre 6,5 e 8,0, turbidez menor do que 0,4 TUB (Termos de Unidades de Turbidez do inglês *Nephelometric Turbidity Unit*), além de ter uma concentração balanceada de íons como cálcio, magnésio, sódio, potássio, sulfato, cloreto, etc. A água é usada no condicionamento (pré-umidificação) do malte, etapa de brassagem, lavagem do bagaço do malte, rinsagem final e lavagem de garrafas, barris e latas (PROCESSO de Fabricação da Cerveja, 2014).

- Cevada

A cevada tem em sua composição um teor de proteína numa proporção ideal em relação ao amido e agentes importantes, como as enzimas e outros que se formarão durante a mosturação. O malte é fabricado durante o malteamento - processo artificial e controlado da germinação da cevada cervejeira. Durante este processo, os grãos de cevada são colocados em condições favoráveis à germinação. Visto que nesta fase o amido do grão possui cadeias menores que na cevada, ele é macio e solúvel. Também, no interior do grão desenvolvem-se enzimas fundamentais para o processo de fabricação da cerveja. Quando o processo de desagregação é alcançado, a germinação é interrompida e o malte é seco até que atinja teores de umidade em torno de 4% (PROCESSO de Fabricação da Cerveja, 2014; INGREDIENTES da Cerveja- 2ª parte: Malte, Adjuntos e Outros Ingredientes, 2014).

A tabela 3 apresenta as composições do grão da cevada e do grão de malte:

Tabela 3: Composição do grão da cevada e grão do malte

Características	Grão da cevada	Grão do malte
Massa do grão (mg)	32 a 36	29 a 33
Umidade (%)	10 a 14	4 a 6
Amido (%)	55 a 60	50 a 55
Açúcares (%)	0,5 a 1,0	8 a 10

Fonte: CEREDA, 1983 apud SILVA, 2005, p. 10.

- Lúpulo

O lúpulo é uma planta do tipo trepadeira *herbaceous*, cujas flores fêmeas possuem grandes quantidades de resinas amargas e óleos essenciais, responsáveis pelo sabor amargo característico da cerveja, que é fundamental para o impacto organoléptico total da cerveja, a estabilidade do sabor e a retenção da espuma (INGREDIENTES da Cerveja, 2014).

A tabela 4 mostra a composição química do lúpulo:

Tabela 4: Composição química do lúpulo e porcentagem de cada componente.

	Composição percentual
Teor de umidade	10 a 12
Resinas totais/ substâncias amargas	12 a 22
Óleos essenciais	0,5 a 2
Lipídios e ceras	3
Proteínas	13 a 18
Substâncias amargas/ polifenóis	4 a 14
Carboidratos/ açúcares	2 a 4
Aminoácidos	0,1 a 0,2
Celulose	10 a 17
Substâncias minerais	7 a 10

Fonte: KUNZE, 1999 apud SILVA, 2005, p.8.

No instante de sua colheita o lúpulo possui um teor de água de aproximadamente 80%, tornando-o inadequado para o armazenamento. Por isso, o lúpulo é seco em estufa, antes de ser estocado e armazenado na forma de pó prensado (SILVA, 2005). O lúpulo é cultivado em climas frios do hemisfério norte, sendo os países do norte europeu e os Estados Unidos os grandes produtores. Portanto, o Brasil importa quase toda a sua necessidade de lúpulo da Europa e Estados Unidos (INGREDIENTES da Cerveja, 2014).

- Adjuntos

A maioria dos países tem o costume de substituir parte do malte de cevada por outros cereais, maltados ou não, e por carboidratos, a fim de tornar a produção mais econômica. As fontes de carboidratos utilizadas em substituição ao malte são chamadas de “adjuntos”. Estes adjuntos são adicionados ao malte da cevada em proporção balanceada, como fonte secundária de carboidratos para o processo de fermentação. Outra vantagem é que se produz uma cerveja mais leve e suave em relação à cerveja feita exclusivamente com malte da cevada (PROCESSO de Fabricação de Cerveja, 2013).

No processo de preparo de cervejas, podem ser usados como complementos todos os cereais que têm em sua composição substâncias ricas em amido. Podem-se citar os cereais: arroz, milho, cevada não maltada, sorgo, mandioca e aveia como exemplos dos principais tipos de adjuntos sólidos utilizados, e açúcar cristal, extrato do malte e extratos de cereais de

adjuntos líquidos. O limite máximo de uso de adjuntos depende da capacidade do malte de cevada em fornecer nutrientes suficientes para a levedura produzir álcool, para a propagação dessa levedura e para a obtenção do sabor desejado da cerveja. Deve-se lembrar de que o uso limitado da quantidade de malte pode levar à insuficiência de nitrogênio, o que é prejudicial para a levedura (MEDEIROS. 2010; INGREDIENTES da Cerveja- 2ª Parte: Malte, Adjuntos e Outros Ingredientes, 2014).

3.1.5 Elaboração da cerveja

O processo de elaboração de cerveja em uma cervejaria, mesmo que em escala micro, envolve as seguintes etapas: moagem, mosturação, clarificação, fervura, resfriamento, fermentação, maturação, filtração, envase e pasteurização. Estas etapas são divididas em dois grandes processos: o preparo do mosto e a transformação do mesmo em cerveja.

3.1.5.1 Preparo do mosto

O preparo do mosto envolve as etapas de moagem do malte, mosturação, clarificação (filtração do mosto), fervura (cozimento) e resfriamento.

- **Moagem do malte**

O malte gerado através da germinação de grãos da cevada e de um processo de morte do embrião é moído. Durante a moagem, o grão é reduzido uniformemente, a fim de se obter:

- (1) rompimento da casca na direção longitudinal expondo o endosperma, porção interna do grão;
- (2) desintegração total do endosperma, promovendo uma melhor atuação enzimática e
- (3) proporção mínima de farinha com granulometria muito fina, evitando a formação de substâncias que produzam uma quantidade excessiva de pasta dentro da solução (HUGO, 2013).

- **Mosturação (atuação enzimática)**

A mosturação compreende a mistura do malte moído com a água, e a adição de seus adjuntos sólidos, caso necessário, e do caramelo, se a cerveja a ser processada for escura. Nesta fase, o malte moído é misturado à água em condições com aumento de temperatura gradual, quando então as enzimas do malte são ativadas e realizam a hidrólise dos

constituintes do mesmo. A mistura obtida passa a ser chamada de mostura. O controle de temperatura tem o objetivo de solubilizar as substâncias solúveis em água, enquanto que as enzimas solubilizam as substâncias insolúveis, promovendo a gomificação e posterior hidrólise catalítica do amido (PROCESSO de Fabricação da Cerveja, 2014). Além disso, na mosturação, o amido é decomposto em açúcares fermentáveis (glicose, maltose e maltotriose) e não fermentáveis (dextrinas). As proteínas também são degradadas em cadeias menores, o que é importante para a formação de espuma e de aminoácidos para a levedura cervejeira (ALVES, 2010).

As enzimas existentes no malte são responsáveis pela decomposição de moléculas. Sabe-se que os fatores como temperatura, tempo, grau de acidez, concentração do meio, qualidade do meio e constituição do produto da moagem, afetam o processo enzimático. Assim, a escolha do tipo de mosturação ou programa de temperaturas, leva à composição e ao tipo de cerveja desejado.

A tabela 5 mostra um resumo da atuação enzimática nas suas melhores condições de pH e temperatura:

Tabela 5: Atuação das enzimas em condições ótimas de pH e temperatura.

Enzima	Atuação	pH	Temperatura (°C)
	Decomposição da hemicelulase em glucanos		
Hemicelulase	de baixa e média massas molares	4,5 a 4,7	40 a 45
	Decomposição das proteínas de alta e média		
Exo-peptidase	massas molares em aminoácidos	5,2 a 8,2	40 a 50
Endo-peptidase	Decomposição das proteínas em produtos intermediários de alta e média massas molares	5,0	50 a 60
	Desagregação do amido em maltose e		
Dextrinase	maltriose	5,1	55 a 60
	Decomposição do amido em maltose		
β -amilase	Decomposição do amido em dextrinas	5,4 a 5,6	60 a 65
	α -amilase inferiores		
		5,6 a 5,8	70 a 75

Fonte: Tschope, 2001 apud SILVA, 2010, p. 14.

- Filtração, fervura e resfriamento do mosto

A etapa de filtração também é conhecida com clarificação do mosto. A retirada do bagaço é feita através da sedimentação natural e efetuada em equipamento cujo fundo é uma peneira, na qual o líquido passa pela camada de cascas de malte depositadas. Em seguida, as cascas são lavadas por meio da passagem de água aquecida nas próprias peneiras de coleta. Depois de filtrada, a mostura passa a ser denominada de mosto. Em seguida, o mosto é levado a um tanque e fervido. Durante este processo, adiciona-se o lúpulo e os adjuntos líquidos (HUGO, 2013).

O processo de fervura estabiliza o mosto e a futura cerveja em quatro aspectos: biológico (esteriliza o mosto), bioquímico (destrói as enzimas remanescentes da fase de mosturação), coloidal (precipita o material proteico) e sensorial (volatiliza os compostos indesejáveis). Além disso, as proteínas maiores são removidas durante a fervura do mosto.

Antes de ser enviado para a fermentação, o mosto precisa ser resfriado porque a levedura não suporta temperatura maior que 100°C. A temperatura de resfriamento depende do tipo de cerveja que será produzida: mostos do tipo *lager* são geralmente resfriados para temperatura entre 7 e 15°C e os do tipo *ale* são resfriados em média entre temperaturas de 18 e 22°C, antes da adição de levedura. Na etapa de resfriamento, ocorre a remoção de material proteico que precipitou durante a fervura (MEDEIROS, 2010).

3.1.5.2 Transformação do mosto em cerveja

A transformação do mosto em cerveja abrange as seguintes etapas: fermentação, maturação, filtração, envase e pasteurização.

- Fermentação do mosto

Assim como a produção do mosto, a etapa de fermentação também influencia de maneira direta na qualidade da cerveja. As leveduras usadas, *Saccharomyces cerevisiae*, para a produção de cervejas do tipo *ale*, e *Saccharomyces uvarum*, para as tipo *lager*, são responsáveis pela transformação do mosto em cerveja, com a formação da maioria dos compostos que dão aroma e sabor característicos (D'AVILA et al, 2012). A levedura é um microorganismo unicelular que obtém sua energia na presença de oxigênio (aeróbio) durante a fase da respiração e, na ausência de oxigênio (anaeróbio), durante a fase de fermentação. Ele é o microorganismo responsável pela fermentação alcoólica na cervejaria. A fase respiratória

(em presença de O₂ no meio), acontece nas primeiras horas de fermentação, sendo evidenciada pela intensa multiplicação celular, formação de membrana, pouca formação de espuma e reduzida queda de substrato. A fase fermentativa começa à medida que o oxigênio é consumido na respiração. A fase anaeróbia de fermentação é evidenciada pela intensa queda de substrato, liberação de calor e formação de espuma (ALVES, 2010). A reação abaixo descreve o processo químico da fermentação. Ela é uma reação exotérmica:



Na reação acima, a molécula de glicose é quebrada, formando duas moléculas de etanol (C₂H₅OH), duas de dióxido de carbono (CO₂) e duas de água (H₂O). Parte da energia liberada na quebra da molécula de glicose na fermentação é usada para ligar o radical fosfato inorgânico (Pi) a molécula de Adenosina Difosfato (ADP) e formar a Adenosina Trifosfato (ATP), molécula que é um reservatório de energia (LEHNINGER et al, 2002).

A fermentação é a fase mais importante para o paladar da cerveja, já que paralelamente à transformação de açúcar em álcool e gás carbônico, são produzidas outras substâncias em pequenas quantidades, que também são responsáveis pelo aroma e sabor do produto. No processo de fermentação, através da transaminação e desaminação de aminoácidos, os cetoácidos são convertidos a álcool por descarboxilação e redução, sendo assim os coprodutos etanol, metanol, 1-propanol, 2-propanol, 2-metil propanol, 3-metil propanol, feniletanol, glicerol e tirosol são tipos de alcoóis presentes na cerveja, embora o etanol esteja presente em maior quantidade (BANFORTH, 2000).

A sacarificação é a fermentação das matérias amiláceas (substratos fornecidos à levedura como sacarose, glicose e frutose) após hidrólise, na qual o amido não fermentável se transforma em açúcar fermentável. A ordem de utilização dos açúcares do mosto, presentes ou obtidos pela sacarificação pela levedura é a seguinte: glicose > frutose > maltose > maltotriose, independente da fermentação ser *ale* ou *lager* (D'AVILA et al, 2012).

As leveduras produzem os compostos ativos do aroma e do sabor da cerveja como subprodutos da síntese de substâncias necessárias ao seu crescimento e metabolismo. A quantidade destes compostos na cerveja varia com os padrões de crescimento celular que são diretamente influenciados pelas condições de processo. Assim, vários pesquisadores têm se interessado pelo estudo da influência das condições de fermentação, concentração,

composição do mosto, temperatura e duração do processo fermentativo sobre as características sensoriais da cerveja (MEDEIROS, 2010).

- Maturação e filtração

No final do processo fermentativo, a cerveja é armazenada ou permanece em tanques em baixas temperaturas, propiciando o desenvolvimento das características sensoriais, desejáveis ao produto final. Este processo de fermentação secundária é conhecido como maturação ou etapa de clarificação da cerveja. Durante este processo, as substâncias formadoras de turvação, como células de levedura, são retiradas no tanque de fermentação e/ou na centrífuga, subprodutos de decomposição de proteínas, polifenóis, entre outros são depositados. A clarificação depende de fatores relacionados às características das substâncias formadoras da turvação, do tempo de maturação e das propriedades do tanque (PROCESSO de Fabricação da Cerveja, 2014).

Após o término da etapa de maturação, as substâncias em suspensão devem ser removidas durante a filtração da cerveja, a fim de eliminar o aspecto turvo. Depois desta filtração, a cerveja recebe dióxido de carbono, além de outras substâncias que irão garantir a qualidade da cerveja e aumentar seu tempo de prateleira, como estabilizantes e antioxidantes, estando pronta para o envase.

- Envase e pasteurização

No envase da cerveja, um complexo de máquinas e equipamentos condiciona a bebida em uma determinada embalagem. Nesta etapa, alguns cuidados são tomados: manter o mínimo de teor de gás oxigênio possível no produto envasado, evitar a perda de dióxido de carbono e a contaminação do produto (ALVES, 2010).

A cerveja envasada é pasteurizada, a fim de se eliminar microorganismos que poderiam prejudicar as características originais da cerveja. Por isso, a pasteurização costuma ser realizada em temperaturas letais a eles. A cerveja envasada antes da pasteurização chama-se “Chopp”. O processo de pasteurização consiste no aquecimento da cerveja à temperatura de 65 °C e posterior resfriamento gradual. Após o processo térmico, a cerveja está pronta para o consumo (REINOLD, 2014).

3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear consiste na detecção da energia ε das radiofrequências por partes de núcleo numa molécula emitida após prévia absorção, na presença de um campo magnético B_0 . Ela é uma das técnicas mais importantes para a aquisição de informações física e química, eletrônica e estrutural das moléculas, de uma forma não destrutiva, podendo fornecer informações a respeito da estrutura tridimensional e da dinâmica das moléculas.

Somente núcleos cujo spin nuclear é diferente de zero são ativos na RMN. Na presença de um campo magnético, a degenerescência dos estados energéticos dos spins é levantada. A diferença de energia entre os estados energéticos dos spins depende do campo magnético no qual eles se encontram. O campo magnético da terra é tão baixo, que a diferença energética é negligenciável e assim, os estados energéticos dos spins são degenerados. Mas, ao colocarmos os núcleos dentro de um campo magnético artificial, *levantamos* esta degenerescência, os diferentes estados energéticos dos spins realmente têm diferentes energias, e transições entre os estados se tornam visíveis. A radiação eletromagnética envolvida nestas transições está na faixa do comprimento de onda ε das radiofrequências e é detectada em um espectrômetro de RMN, através da radiação emitida pelos núcleos quando estes voltam ao estado fundamental.

3.2.1 Fundamentos da RMN

Um núcleo com spin nuclear I possui $2I+1$ estados de spin nuclear degenerados, caracterizados pelo número quântico $m_I = I, (I-1), (I-2), \dots, -I$. O momento angular intrínseco \mathbf{P} de um núcleo com spin I tem $2I+1$ projeções num eixo escolhido arbitrariamente, como por exemplo, o eixo dos z :

$$P_{zz} = \frac{m * h}{2\pi}$$

onde h é a constante de Planck (HONARK, 2011).

Um núcleo em rotação tem também um momento magnético μ , proporcional ao seu momento angular de spin \mathbf{P} , segundo a equação:

$$\mu = \gamma * P$$

O fator de proporcionalidade γ , chamada de constante giromagnética, possui valor específico e constante, para o isótopo de cada elemento (nuclídeo).

A tabela 6 mostra os valores de momento angular de spin e da constante giromagnética γ para cada núcleo. A γ está relacionada com a sensibilidade do núcleo. Sendo assim, quanto maior γ , maior será a sensibilidade do experimento de RMN (ESCHER, 2004).

Tabela 6: Propriedades dos nuclídeos.

Isótopo	γ (relativa)	Frequência de ressonância à	Abundância Natural	Sensibilidade relativa
		11,7 T (MHz)	(%)	
^1H	100	500	99,98	1
^{13}C	25	125	1,1	10^{-5}
^{15}N	-10	50	0,37	10^{-7}
^{19}F	94	455	100	0,8
^{29}Si	-20	99	4,7	10^{-3}
^{31}P	-40	203	100	0,07

Fonte: Tabela adaptada do ATKINS, 2006. p. 516

Na ausência de um campo magnético, os momentos magnéticos estão orientados aleatoriamente em todas as direções. Todas as orientações $2\mathbf{I}+1$ de um núcleo com spin \mathbf{I} tem a mesma energia, uma vez que a distribuição dos momentos magnéticos é completamente isotrópica. Quando se aplica um campo magnético B_0 , a degenerescência dos estados de spin deixa de existir e, para um núcleo com $\mathbf{I}=1/2$, o momento magnético pode assumir duas orientações: (α) paralela e (β) anti-paralela à direção do campo magnético. Quanto maior for a intensidade do campo magnético aplicado, maior será a diferença energética entre os dois estados de spin nuclear, e conseqüentemente, mais acentuada será a diferença de populações entre os dois estados. A diferença entre a população de núcleos paralelos e antiparalelos à B_0 é relacionada pela distribuição de Boltzman, segundo a equação:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\Delta E/kT}$$

onde N_α e N_β representam, respectivamente, as populações nos estados de spin α e β ; k é a constante de Boltzman e T a temperatura absoluta.

A figura 3 mostra os dois níveis de energia do spin em um campo magnético de magnitude B_0 , cujas populações dos estados de spin nuclear são N_α e N_β :

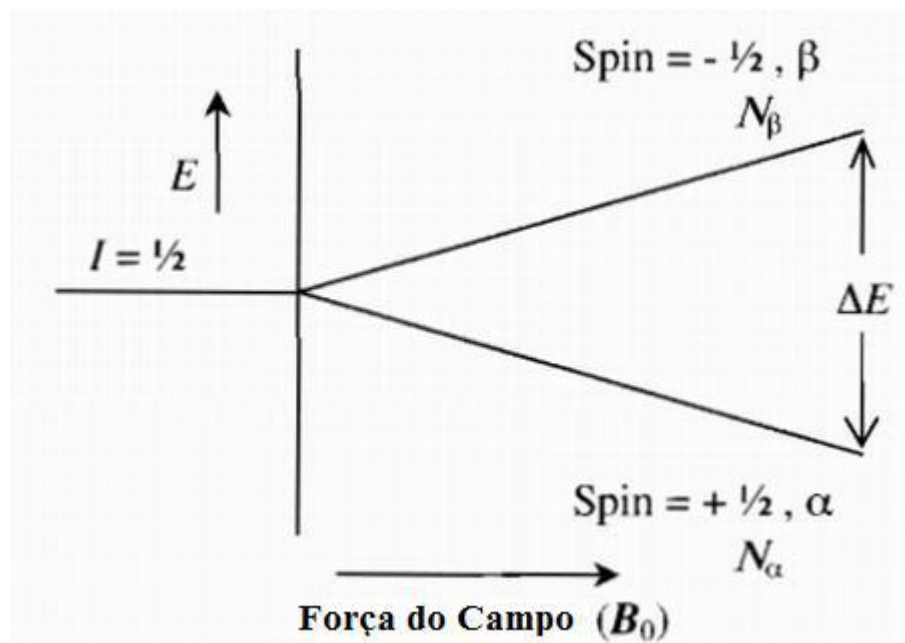


Figura 3: Níveis de energia do spin em campo magnético B_0 . N é a população de spins acima (N_α) e abaixo (N_β). A força de B_0 aumenta para a direita. Figura adaptada do ATKINS, 2006. p. 128.

As transições entre esses dois níveis de energia ocorrem somente por absorção (ou emissão) de uma radiação com frequência relativa à diferença de energia dos níveis: $\Delta E = h\nu$ (ATKINS, 2006). Esta diferença de energia depende dos campos magnéticos envolvidos e é dada pela equação:

$$\Delta E = \frac{h}{2\pi} * \gamma * B_0$$

onde ΔE é proporcional ao campo magnético de magnitude B_0 (SILVERSTEIN et al, 2005).

Os spins dos núcleos polarizados entram em movimento de precessão em torno do eixo de aplicação B_0 e diz-se que os núcleos estão em ressonância com a radiação aplicada. A frequência desta energia de precessão chama-se frequência de ressonância ou frequência de Larmor ν_L e é dada pela equação abaixo:

$$\nu_L = \frac{\gamma * B_0}{2\pi}$$

A frequência de luz sob determinada força do campo magnético na qual os núcleos de cada elemento absorvem depende do ambiente eletrônico ao redor destes núcleos, já que os elétrons também são afetados pelo campo magnético. Assim, a frequência de Larmor de um

núcleo numa molécula, que foi definida pela expressão anterior deve, em rigor, ser definida por:

$$\nu_L = \frac{\gamma * B_{ef}}{2\pi}$$

em que B_{ef} é o campo magnético efetivamente sentido pelo núcleo. B_{ef} é inferior a B_0 devido ao efeito de blindagem exercido pelo campo magnético local criado pela densidade eletrônica do próprio núcleo e que é afetado pelo seu ambiente químico. O campo magnético efetivo, B_{ef} , está naturalmente relacionado com B_0 , mas resulta também do efeito de blindagem magnética, σ , que depende da vizinhança do núcleo de interesse (ATKINS, 2006).

$$B_{ef} = B_0 * (1 - \sigma)$$

Núcleos quimicamente não equivalentes sofrem diferentes efeitos de blindagem e tem, por isso, diferentes ressonâncias de Larmor, originando sinais separados no espectro. A posição, ou seja, o desvio químico δ , de cada sinal é uma grandeza relativa que relaciona a frequência de ressonância de um núcleo (ω) com a frequência de ressonância de um composto de referencia (ω_{ref}) e é independente da intensidade do campo magnético estático B_0 (SILVERSTEIN et al, 2005).

$$\delta = \frac{\omega - \omega_{ref}}{\omega_{ref}}$$

3.2.2 Aquisição do espectro

O espectrômetro expõe os núcleos a um campo magnético estático (B_0) que alinha os momentos magnéticos dos núcleos. Em seguida, um segundo campo magnético (B_1) perpendicular a B_0 , é aplicado à amostra por um curto período (1-100 microsegundos), com um pulso. Esse pulso perpendicular faz com que os momentos magnéticos dos núcleos mudem de direção em um caminho circular de precessão; um efeito que pode ser medido por uma bobina de detecção ao redor da amostra. Assim que o pulso é interrompido, a precessão diminui à medida que os núcleos se realinham com o campo magnético estático B_0 . Esse processo é chamado de relaxação e ocorre por diferentes mecanismos, que estão relacionados com a identidade da amostra. A partir deste processo, um gráfico da intensidade do sinal medido pelo detector versus tempo é chamado de decaimento de livre indução (DLI) ou FID, do inglês *Free Induction Decay*). O DLI é um interferograma complexo cujo conteúdo possui todas as frequências que são emitidas simultaneamente durante o decaimento e é um registro de intensidades em função do tempo (SILVERSTEIN et al, 2005).

Uma função matemática chamada de transformada de Fourier (TF) ou (FT do inglês *Fourier Transform*) é aplicada ao sinal do DLI e o converte para uma representação de intensidades em função da frequência, resultando no “espectro de RMN”.

A figura 4 mostra o espectro de RMN após a TF do FID. As vantagens de tais técnicas de pulso incluem a capacidade de poder armazenar dados digitalmente em um computador, que pode registrar vários espectros e calcular quaisquer cálculos que se façam necessários (ALVES, 2010).

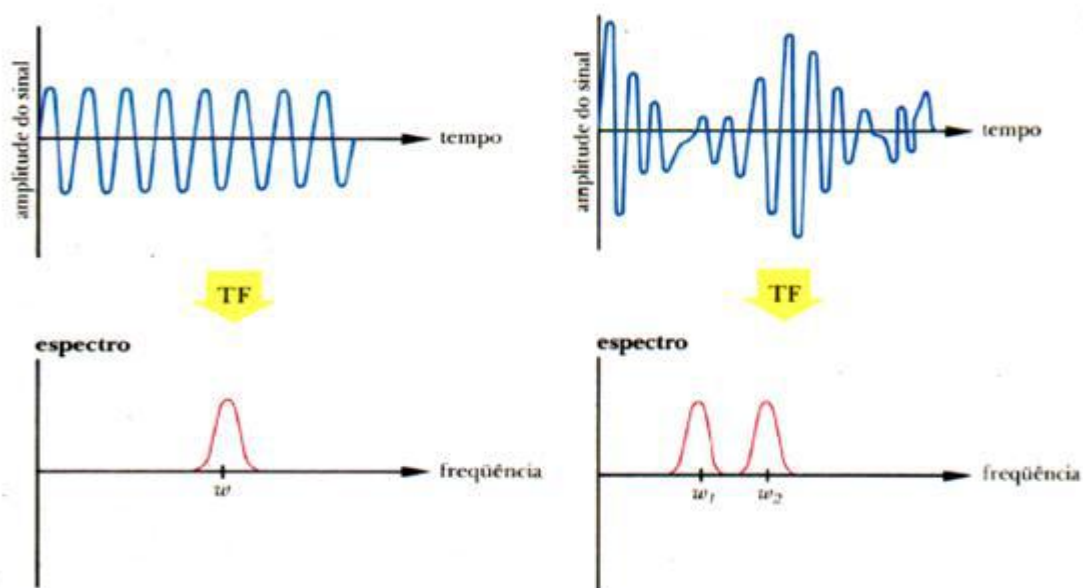


Figura 4: Aplicação da Transformada de Fourier para aquisição de espectro de RMN. Os espectros com domínios de tempo resultam em espectros com domínio de frequência e respectivos deslocamentos químicos após a Transformada de Fourier (TF) computadorizada. Figura adaptada do FREITAS, 2009.

3.3 Análise por Componentes Principais (ACP)

A Análise por Componentes Principais, (ACP), do inglês *Principal Component Analysis (PCA)*, é uma técnica estatística multivariada desenvolvida para extração de dados de grandes matrizes contendo numerosas linhas e colunas. Uma das razões para o uso de ACP se deve a enorme quantidade de dados produzidos por técnicas analíticas. Componentes principais reduzem o número de variáveis através de combinações lineares, sendo estas variáveis, por exemplo, o comprimento de onda de espectros (FARO Jr, 2010). A ACP simplifica a representação dos dados da matriz chamada de multivariada ou multidimensional.

Na matriz de dados, m variáveis são medidas para cada amostra (n), conforme a figura 5 abaixo.

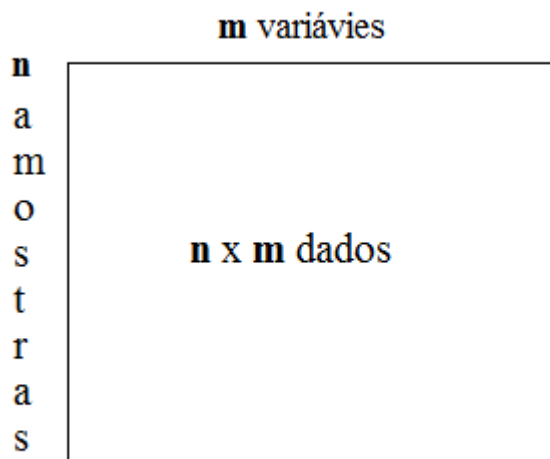


Figura 5: Representação de uma matriz de dados com m variáveis e n amostras. Figura adaptada do MASSART, 1997. p. 520

Usualmente, mais de uma variável é medida em análises químicas. O número de dimensões é igual ao número de variáveis medido para cada amostra ou objeto. Assim, os dados provenientes da matriz de dados nos quais m -variáveis são medidas, são m -dimensionais. Eles são chamados multivariados e visualizados em gráficos m -dimensionais. A ACP correlaciona estatisticamente as colunas da matriz de dados e assim pode indicar se uma variável contribui mais para diferenciação das amostras, se as variáveis estão correlacionadas, ou ainda se são independentes umas das outras.

A ACP é sempre usada a fim de se fazer estudos preliminares da estrutura dos dados. Determina-se o maior número de variáveis e espera-se que os padrões de resultados dos dados permitam diferenciar diversas amostras (ou objetos). A ACP é utilizada principalmente como ferramenta de análise na exploração de dados e criação de modelos preditivos, como na classificação de bebidas, metabólica, química analítica e detecção de alterações sutis da natureza de cromatogramas que não são visíveis a um operador, análise de imagens, dentre outros (SILVÉRIO, 2008).

A principal característica da ACP é a redução das dimensões, quase sem perda de informação. Isto é possível porque ela projeta dados m -dimensionais, em um espaço de baixa dimensionalidade; normalmente duas ou três. A importância de cada eixo em um gráfico de

componentes principais (CP), é mostrada em termos de sua respectiva variância, apontando quanta informação é extraída em cada componente. De uma forma geral, 70%, ou mais, da variância está contida nos dois primeiros componentes principais. A maior parte das informações contidas nos dados originais é transformada no primeiro componente principal (CP1) e a segunda e terceira maiores informações são transformadas no segundo e terceiro componentes principais (CP2 e CP3), respectivamente (MASSART, 1997).

Em uma análise por componentes principais, o conjunto das amostras estabelece a estrutura dos dados através de gráficos de *scores* e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (CPs) sobre os quais os dados são projetados. Os *scores* indicam a composição das CPs em relação às amostras, enquanto que os *loadings* fornecem essa mesma composição em relação às variáveis. Já que as CPs são ortogonais entre si, é possível avaliar as relações entre amostras e variáveis através dos gráficos dos *scores* e dos *loadings*. Além disso, o estudo do conjunto dos *scores* e *loadings* permite estimar a influência de cada variável em cada amostra (VASCONCELOS, 2013).

Na figura 6 os dados são estruturados em uma pequena extensão ao redor de uma linha reta. A projeção dos dados nesta figura mostra alguma diferenciação entre as diferentes categorias, mas para o exemplo, a separação entre os grupos 5-6-7 e 8-9-10 não pode ser observada.

Observa-se que existe alguma variação ao redor do CP1, mas procede-se com a determinação do CP2. Este é ortogonal ao CP1. O CP2 é desenhado na direção da maior quantidade de variação residual ao longo do CP1. Os diferentes pontos podem ser projetados nos CP1 e CP2, e o resultado dos *scores*, usados como novas coordenadas (figura 7) para cada ponto no plano CP1-CP2 (MASSART, 1997).

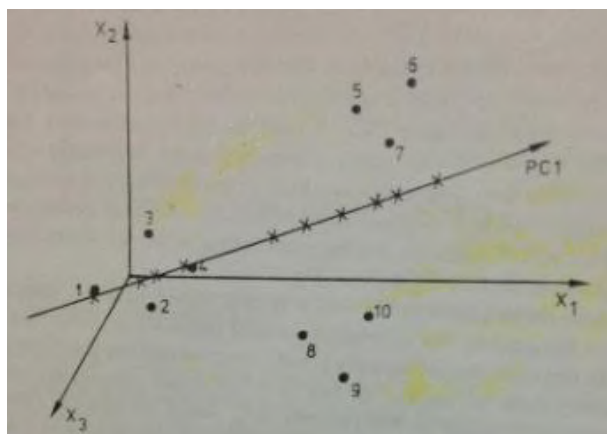


Figura 6: Projeção dos pontos em CP1 para o conjunto de dados. Figura adaptada do MASSART, 1997. p. 526.

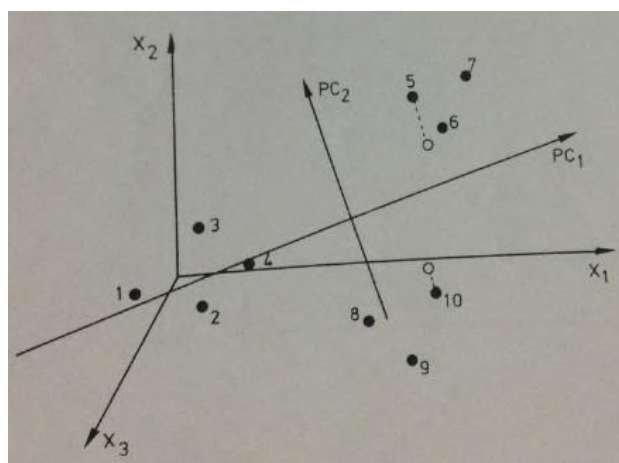


Figura 7: O plano PC1-PC2. Projeções neste plano produziriam uma boa representação dos dados originais. Figura adaptada do MASSART, 1997. p. 526.

Para a ACP, foram construídas matrizes dos espectros das amostras. Nestas matrizes, os espectros representavam as linhas, e os deslocamentos químicos, as colunas.

A figura 8 mostra o resultado da ACP de cinco amostras escolhidas aleatoriamente no universo das amostras de cervejas estudadas e analisadas na região do deslocamento químico dos alifáticos. Nesta figura, os gráficos menores, na parte de baixo, apresentam combinações de componentes principais (CP ou PC em inglês). Eles representam a variância explicada pelo modelo. Ao atingir um patamar, o aumento do número de CP's não acrescenta mais explicação significativa ao modelo.

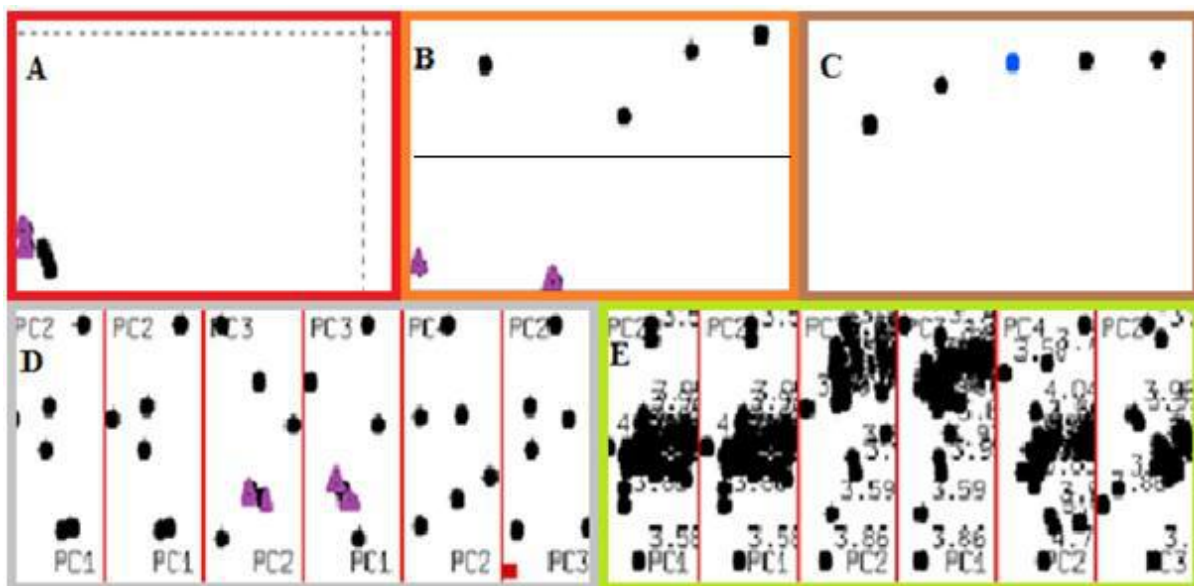


Figura 8: As sub-regiões A, B, C, D e E mostram respectivamente: grau de confiabilidade do modelo; distância das amostras em relação ao modelo; curva da variância explicada; gráfico de *scores* e *loadings* obtidos com os espectros de RMN na faixa dos alifáticos. Em roxo estão marcadas as cervejas do estilo PAL: Becks e Heineken.

Os gráficos A, B, C, D e E da ACP, apresentado na figura 8, fornecem as seguintes informações:

- A) Proximidade das amostras ao modelo, onde a linha pontilhada representa 95% de confiabilidade do modelo. O canto inferior à esquerda corresponde à confiabilidade melhor que 95%.
- B) Distância das amostras para o modelo, uma vez que a linha horizontal situada no meio desta figura simboliza o marco zero para o modelo. Sendo assim, qualquer amostra acima desta linha distanciou-se positivamente do modelo, enquanto que ocorre o contrário para uma amostra abaixo desta linha. Amostras equidistantes desta linha indicam que a representação do modelo foi equilibrada. Se o modelo estiver muito longe de algumas amostras e bem perto de outras, a representação não é equilibrada.
- C) Quanto da variância das amostras é explicada pelos componentes principais. Em azul está marcado o CP com que a variância explicada ultrapassa 95%.
- D) Correlação dos valores representando os espectros numa combinação de diferentes CPs. Quanto mais próximos os pontos estiverem no gráfico da ACP, maior será a

similaridade das propriedades escolhidas para análise da ACP. E assim, pode-se formar uma classe de amostras com características químicas em comum.

- E) A relação entre as variáveis no espaço do novo componente principal e espaço espectroscópico original é descrita pelos *loadings*. Os pontos nos *loadings* no ACP fornecem a ligação entre a interpretação estatística e espectroscópica. Isto é fundamental porque a análise da ACP dos gráficos da figura D revela fenômenos estatísticos, mas não explica os fenômenos químicos. Os pontos dos *loadings* mostram como os componentes principais estão relacionados com as *coordenadas* originais. Ao invés de um cálculo de ACP com o maior número possível de CPs, seleciona-se um pequeno número de CPs no qual a maior parte da variância é explicada. Esses CPs abrangem um espaço reduzido de variância chamado espaço modelo. Cada ponto dos *loadings* indica que deslocamentos químicos foram responsáveis pela diferenciação.

A maioria das aplicações da ACP é para análises qualitativas, isto é, a ACP é usada para testar se existem efeitos significativos em um conjunto de dados. Alguns estudos podem ser feitos com um pequeno número de dados. Assim, se o trabalho consiste na seleção de parâmetros, variáveis e amostras para a obtenção de um resultado, como a separação entre dois grupos, a ACP é utilizada (BRUKER, 2008).

Uma vez que a ACP fornece uma análise preliminar dos dados e deste modo agrupa padrões por meio das similaridades ou diferenças entre as amostras, pode-se construir modelos a partir desta separação entre os grupos das amostras. A construção do modelo requer perícia e interpretação cuidadosa dos detalhes (BRUKER, 2008).

Capítulo 4: Materiais e métodos

Este capítulo consiste na apresentação dos materiais e métodos utilizados na aquisição deste trabalho: seleção de amostras e preparo das amostras para análise por RMN, tratamento dos dados, análise por componentes principais e equipamentos utilizados.

4.1 Materiais e reagentes

- D2O (D, 99,96% contendo 0,01 mg/ mL DSS);
- 25 mL de cerveja
- 1 proveta de 25 ml
- 1 erlenmeyer de 50 mL
- 1 fumil de vidro
- 1 balão de vidro de fundo redondo
- 1 frasco de liofilizador Edwards

4.2 Equipamentos

- Espectrômetro Bruker 400MHz DMX-400;
- Espectrômetro Bruker 500MHz AV-500;
- Liofilizador Christ, modelo Beta 2-16;
- Gerador de *Ultrasound Unique Ultrasonic Cleaner*, modelo USC -750A, frequência 25KHz.

4.3 Seleção das amostras

As cervejas foram adquiridas nos supermercados e selecionadas de acordo com a disponibilidade, de forma que abrangessem a maior quantidade de estilos de cerveja comercializada e que tivessem aditivos diferentes. A tabela 7 mostra os estilos e as características das cervejas analisadas.

Tabela 7: Estilo e característica das cervejas analisadas.

Estilo	Característica	Marca da Cerveja
German Pilsner (GP)	Pilsen	Bitburger DAB Fürsten König Warsteiner Werner
Kölsch (K)	Híbrida	Gäffel Eisenbahn Kölsch

Premiun American Lager (PAL)	Suave	Amstel Becks Duff Beer Heineken Mahou Stella Artois
Pale Ale	Ale	Colorado Eisenbahn Pale Ale
Pilsen	Pilsen	Bohemia Eisenbahn Pilsen
Standard American Lager (SAL)	Suave	Antarctica Antarctica sub-zero Brahma Budweiser Carlsberg Devassa Kaiser Quilmes Schin Skol Skol International
Rauch Bier	Amadeirada	Eisenbahn Rauch Bier

4.4 Preparo das amostras

O volume de 25,0mL de cerveja a ser analisada foi submetido ao ultrassom por vinte minutos e em seguida foi evaporado a pressão reduzida (liofilizado). O resíduo obtido foi deixado no dessecador por 24 horas e então pesado. As amostras foram armazenadas em frascos de vidro, devidamente selados e identificados.

4.5 Análise por RMN

Foram pesadas, em frascos previamente tarados, cerca de 10 mg de cada amostra obtida conforme descrito no item 4.4. A estas foram adicionados 0,7 mL de óxido de deutério (D₂O). A solução obtida foi transferida para um tubo de RMN de 5 mm de diâmetro, para análise.

Os espectros de RMN ¹H e foram adquiridos em um espectrômetro Bruker 400MHz operando a 400,15 MHz, em uma sonda de 5 mm Quattro Nucleus Probe (QNP) com software de aquisição TopSpin versão 1.3 e processados com o software TopSpin Plot Editor.

A aquisição dos espectros foi realizada a uma temperatura de 25°C. Os espectros foram obtidos com supressão do sinal da D₂O (4,8 ppm) e o ácido 4,4-dimetil 4-silopentano

1-sulfônico (DSS) foi referência. Os parâmetros utilizados para aquisição dos espectros foram: janela espectral de 18,60 ppm, número de pontos 64 k, tempo de espera entre os pulso (*delay time*) de 1 segundo, número de transientes igual a 64 e um tempo de aquisição de 4,4 segundos.

Os experimentos de Espectroscopia Ordenada por Difusão (DOSY do inglês *Diffusion Ordered Spectroscopy*) foram adquiridos com a mesma amostra a 25°C em um espectrômetro Bruker 500MHz AV-500 operando RMN de próton na frequência de 500,13 MHz. No total para os espectros de DOSY foram observados 256 experimentos cada um consistindo de 8 *scans*.

Após a realização da transformada de Fourier dos FIDs, os espectros foram manualmente colocados em fase e tiveram sua linha de base corrigida.

4.6 Análise dos Componentes Principais

Os FIDs dos experimentos de ^1H das cervejas foram submetidos à Análise de Variância com aplicação do teste de comparação múltipla de Tukey ao nível de significância de 5% e estatística multivariada com aplicação da Análise de Componentes Principais utilizando o software Amix Viewer & Amix Tools, versão 3.8 (BRUKER, 2008).

Uma vez que cada ponto dos *loadings* indica quais deslocamentos químicos foram responsáveis pela diferenciação, identificou-se as substâncias químicas responsáveis por esta diferenciação usando-se a tabela do anexo A. Os deslocamentos químicos foram destacados nos *loadings* e usou-se uma margem de erro de 0,01 ppm no deslocamento químico na identificação das substâncias na tabela citada.

4.7 Construção do modelo de ACP através de espectros de RMN

O modelo foi construído com um grupo de espectros previamente submetidos a ACP e então descritos em um conjunto, por exemplo, conjunto de espectros normais. Escolheu-se espectros de diferentes estilos de cervejas para participar na construção do modelo. Caso o espectro tenha comportamento extraordinário, afastando-se muito da linha que representa o modelo, este espectro deve ser retirado e um novo modelo deve ser construído (BRUKER, 2008).

Os testes de validação foram feitos usando-se espectros de cervejas do banco de dados que pertenciam aos mesmos estilos de cervejas usados na construção do modelo.

Capítulo 5: Resultados e Discussão

Este capítulo tem o objetivo de expor os resultados obtidos através do RMN, mostrando as características da composição da bebida observadas pela técnica, bem como discutir as diferenças entre os estilos de cada cerveja a serem analisadas pelo ACP.

5.1 Análise da cerveja por ^1H -DOSY

A técnica analítica denominada de Espectroscopia de Difusão Ordenada (“DOSY” do inglês “Diffusion Ordered Spectroscopy”) monitora a amplitude dos ecos de spin, na presença de um gradiente de campo magnético pulsado, para medir a difusão molecular (SOUZA, 2002). O coeficiente de difusão de uma molécula depende de uma série de fatores. Os mais importantes são a conformação da molécula, que define o diâmetro médio de colisão, as polaridades da molécula e do solvente, o solvente e a temperatura.

A difusão da molécula na solução se torna observável ao RMN, se for aplicado um gradiente, fazendo com que diferentes volumes da amostra tenham diferentes campos magnéticos. Neste caso, o começo do experimento de RMN ocorre em um volume, e a observação do FID em outro. Como diferentes compostos de uma mistura terão diferentes coeficientes de difusão, os sinais dos compostos nos espectros também terão diferentes variações e um ajuste permitirá a separação. Sendo assim, fez-se a análise do DOSY a fim de se observar o número mínimo de compostos na cerveja através da quantidade dos coeficientes de difusão moleculares observados.

A técnica ^1H -DOSY de RMN foi aplicada à cerveja aleatória, Itaipava, seguindo o procedimento de preparo de amostra descrito no item 4.4.

A figura 9 exibe o espectro DOSY, no qual os deslocamentos químicos são apresentados na dimensão *F2* (eixo horizontal) e os coeficientes de difusão moleculares são mostrados na *F1* (eixo vertical). Cada linha corresponde a um espectro ^1H 1D, cuja origem é uma molécula com um coeficiente de difusão molecular característico. Para misturas com poucos componentes, cujos coeficientes de difusão diferem entre si, é possível extrair os espectros ^1H 1D das linhas e assim reconstruir o espectro da mistura. No caso de misturas mais complexas, com muitas moléculas ou com moléculas muito similares, isto não funciona muito bem.

O número de picos observados na dimensão do coeficiente de difusão indica o número mínimo de componentes que se encontram na mistura. O espectro mostra bem destacado o

sinal da água em 4,8 ppm, e um conjunto de sinais superpostos com um coeficiente de difusão menor.

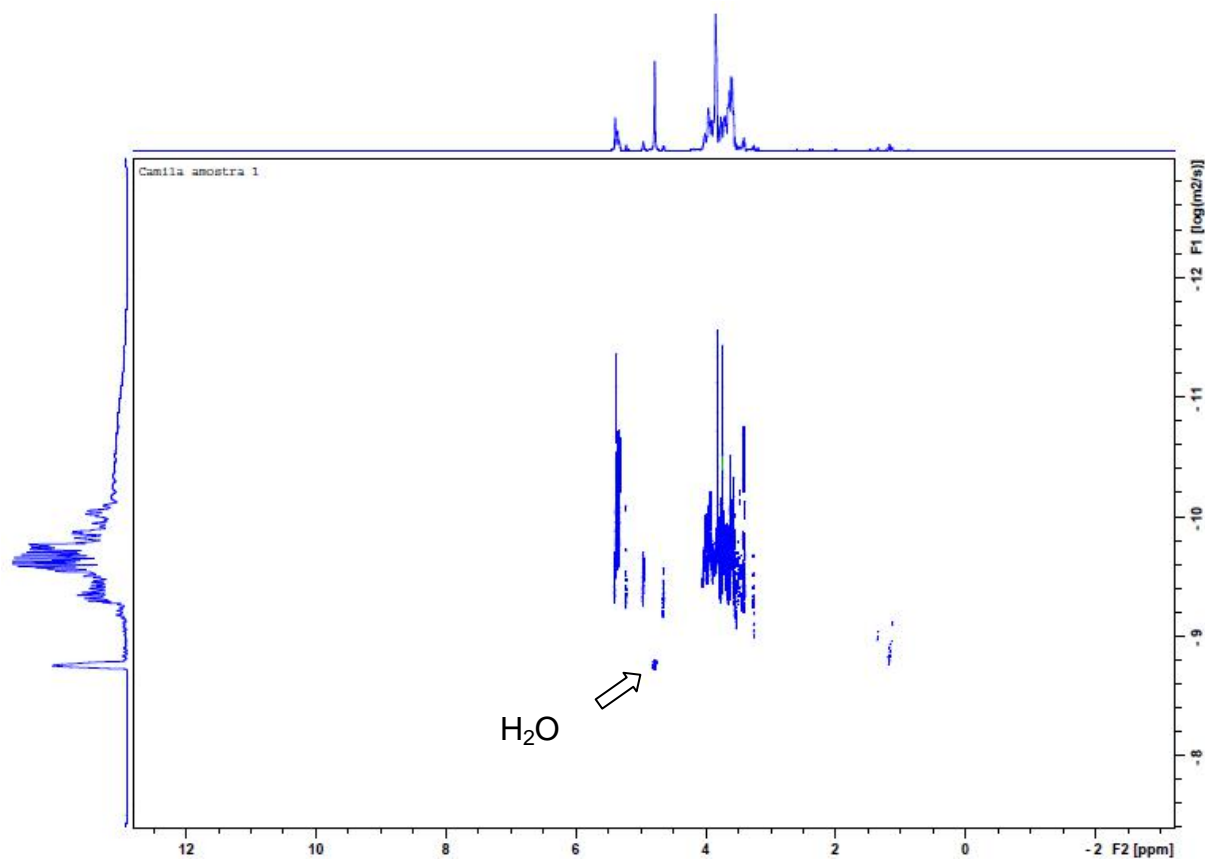


Figura 9: Espectro de ^1H -DOSY da cerveja Itaipava. Os eixos, horizontal F2 e vertical F1, representam, respectivamente, os deslocamentos químicos e os coeficientes de difusão moleculares.

Na figura 10, na qual se ampliou o espectro DOSY da cerveja Itaipava, é possível identificar pelo menos 32 picos na dimensão do coeficiente de difusão, significando pelo menos 32 componentes na mistura. Na figura observa-se, na projeção no lado esquerdo, pelo menos 28 compostos com coeficiente de difusão menores do que o do da água, cujos coeficientes de difusão variam em 2 ordens de magnitude. Devido à superposição dos sinais dos compostos (na horizontal do espectro) não foi possível observar uma separação com a difusão. Portanto, a cerveja é um mistura complexa contendo no mínimo 32 substâncias diferentes.

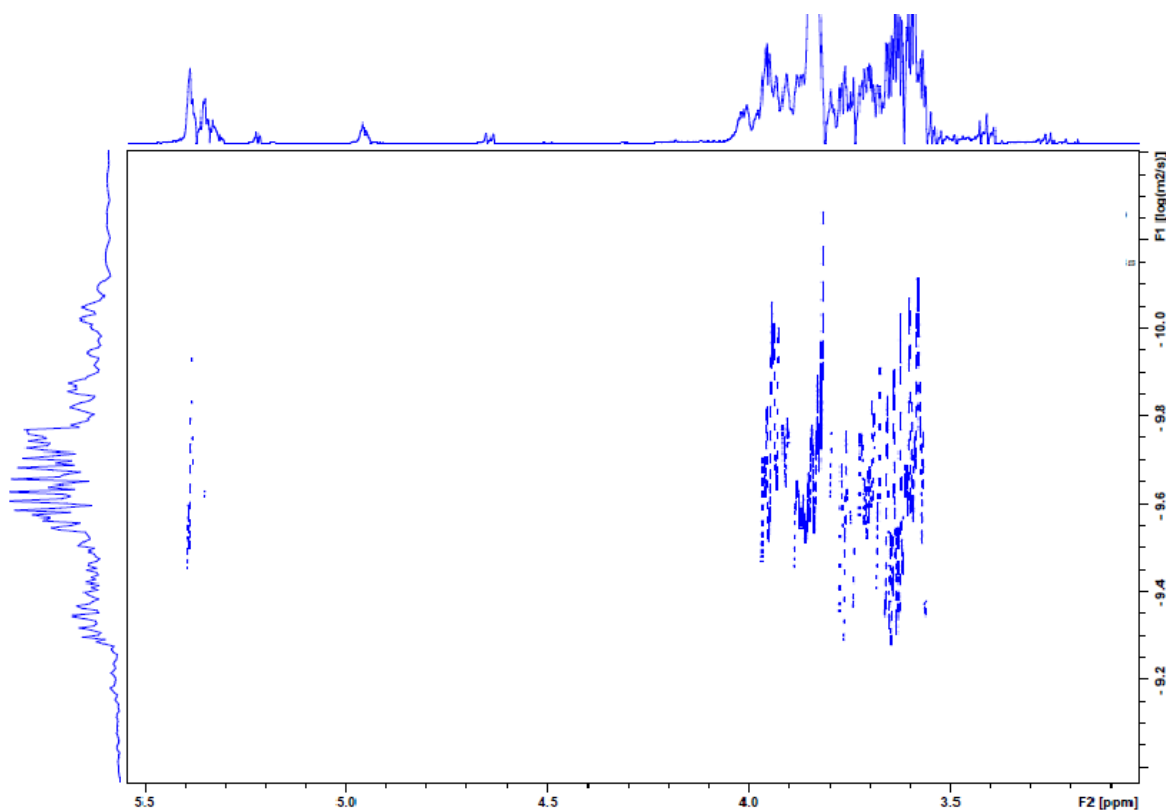


Figura 10: Espectro de DOSY ampliado da cerveja Itaipava.

5.2 Características da composição da cerveja por RMN

Os espectros de RMN de ^1H 1D confeccionados durante o desenvolvimento deste trabalho estão no apêndice A. Os compostos químicos foram assinalados usando o trabalho de Khatib, conforme a tabela do anexo A, que expõe os deslocamentos químicos de cada composto (KHATIB, 2006). Na figura 11 está representada a expansão de um espectro de RMN ^1H 1D, dividido na faixa alifática (0 – 3,0 ppm), na faixa dos açúcares (3,0-5,5 ppm) e na faixa dos aromáticos (5,8-9,0 ppm). Nelas, algumas substâncias identificadas pelo RMN estão assinaladas.

Na faixa dos açúcares nota-se a forte sobreposição de sinais e daí a dificuldade de identificação. Na faixa anomérica (4,4-5,5 ppm) é possível identificar o duplete a 4,64 ppm proveniente da ligação $\text{H1}\beta$ de açúcares redutores, enquanto que a 5,22 ppm se encontra o duplete da ligação $\text{H1}\alpha$. O sinal largo a 5,3-5,4 ppm é característico de dextrinas que por serem moléculas maiores não são facilmente fermentáveis pela levedura. Os sinais dos hidrogênios dos açúcares podem ser observados entre δH 3 e δH 5,5 no espectro de RMN de ^1H . Isto se deve ao fato que todos os hidrogênios têm um oxigênio na distância J2. Devido a isto esta comumente é chamada de "faixa dos açúcares".

Na faixa alifática, observam-se os sinais dos ácidos orgânicos (acético, pirúvico e succínico), provenientes do ciclo de Krebs e de alguns aminoácidos: estes em pequenas quantidades por serem consumidos pelo metabolismo das leveduras.

Na faixa aromática (5,8-9,0 ppm), os sinais são fracos e provenientes de compostos aromáticos, notadamente aminoácidos (histidina, fenilalanina e tirosina) e nucleotídeos (citidina, adenosina e uridina).

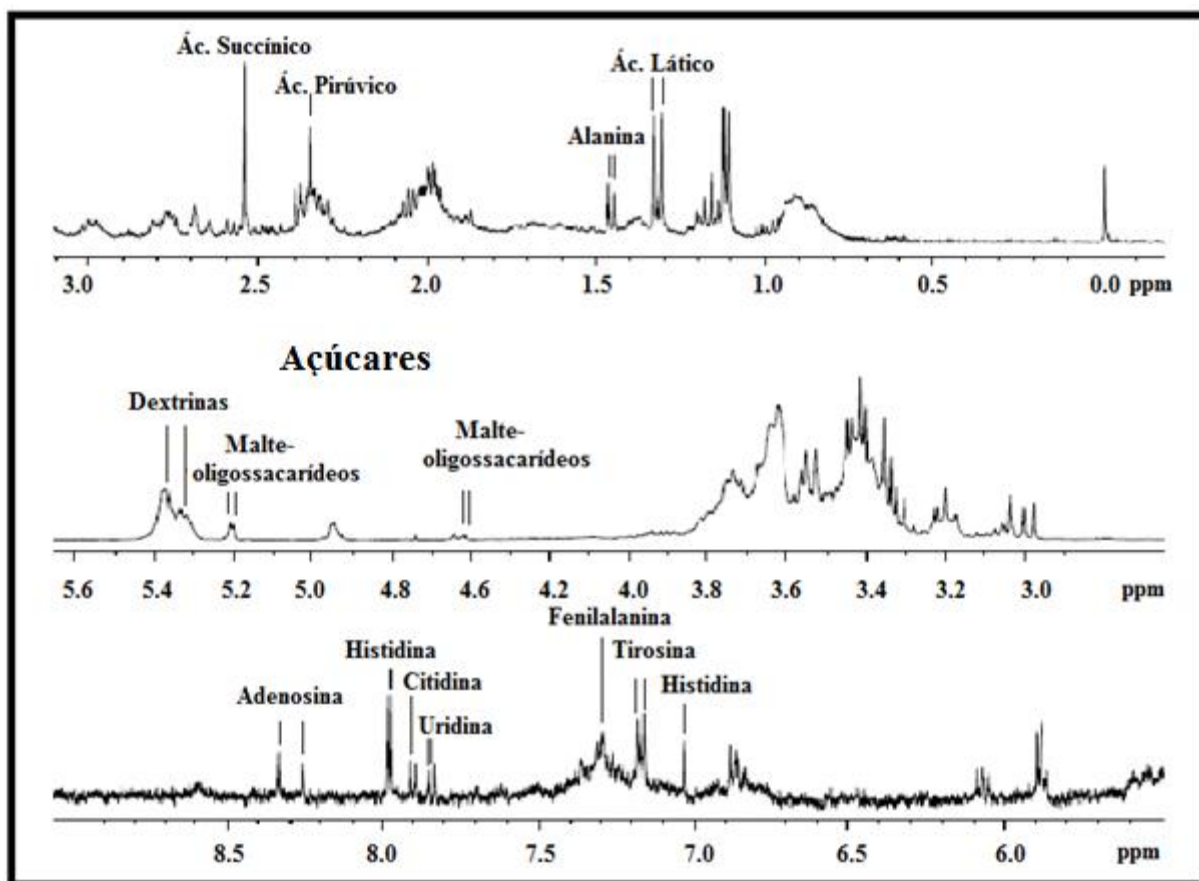


Figura 11: Expansão do espectro de RMN de ¹H 1D da cerveja no qual alguns compostos químicos estão assinalados.

Apesar das cervejas terem diferentes substâncias e em quantidades diferentes, através dos espectros de RMN, estas diferenças não podem ser percebidas. As Figuras 12, 13 e 14 apresentam os espectros de 7 cervejas de diferentes estilos dentre as estudadas, de forma que seja possível entender a dificuldade e complexidade de se separá-las, independente da faixa (de alifáticos, de açúcares e de aromáticos). Os estilos de cada cerveja são mostrados entre parênteses.

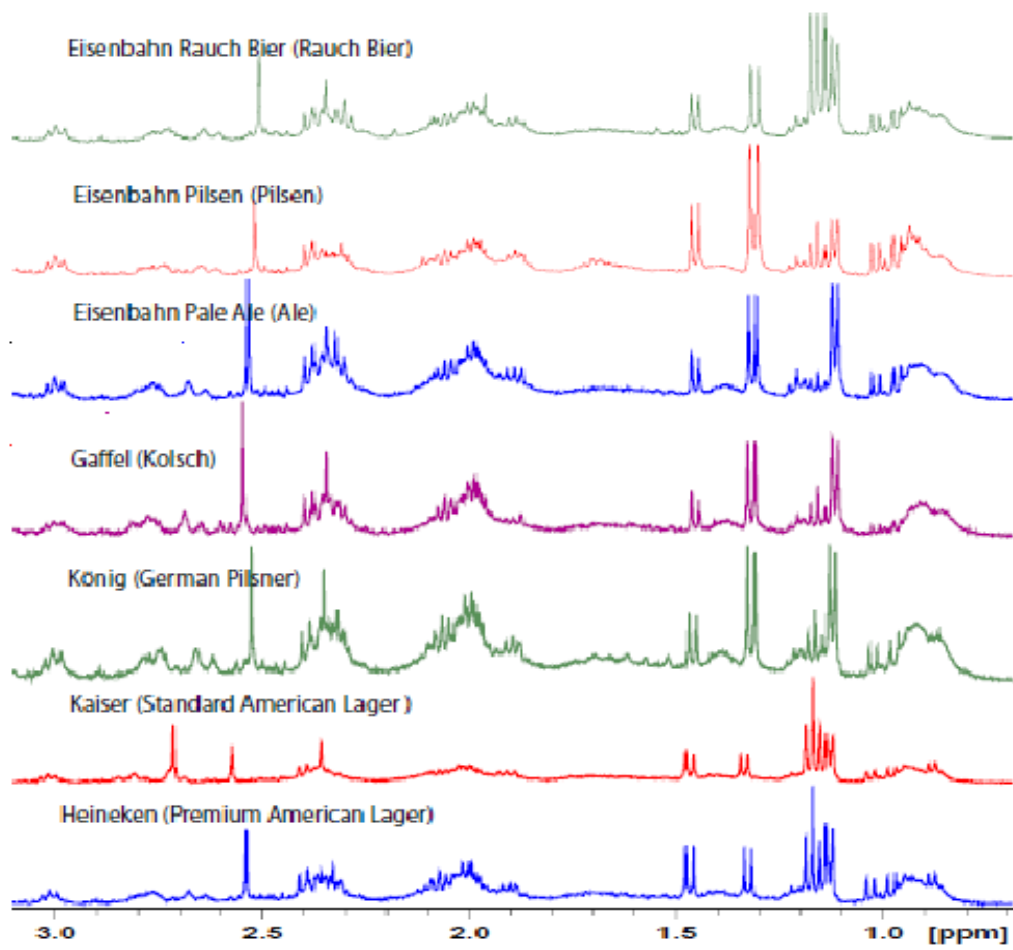


Figura 12: Espectros de RMN de diferentes estilos de cerveja na faixa dos alifáticos.

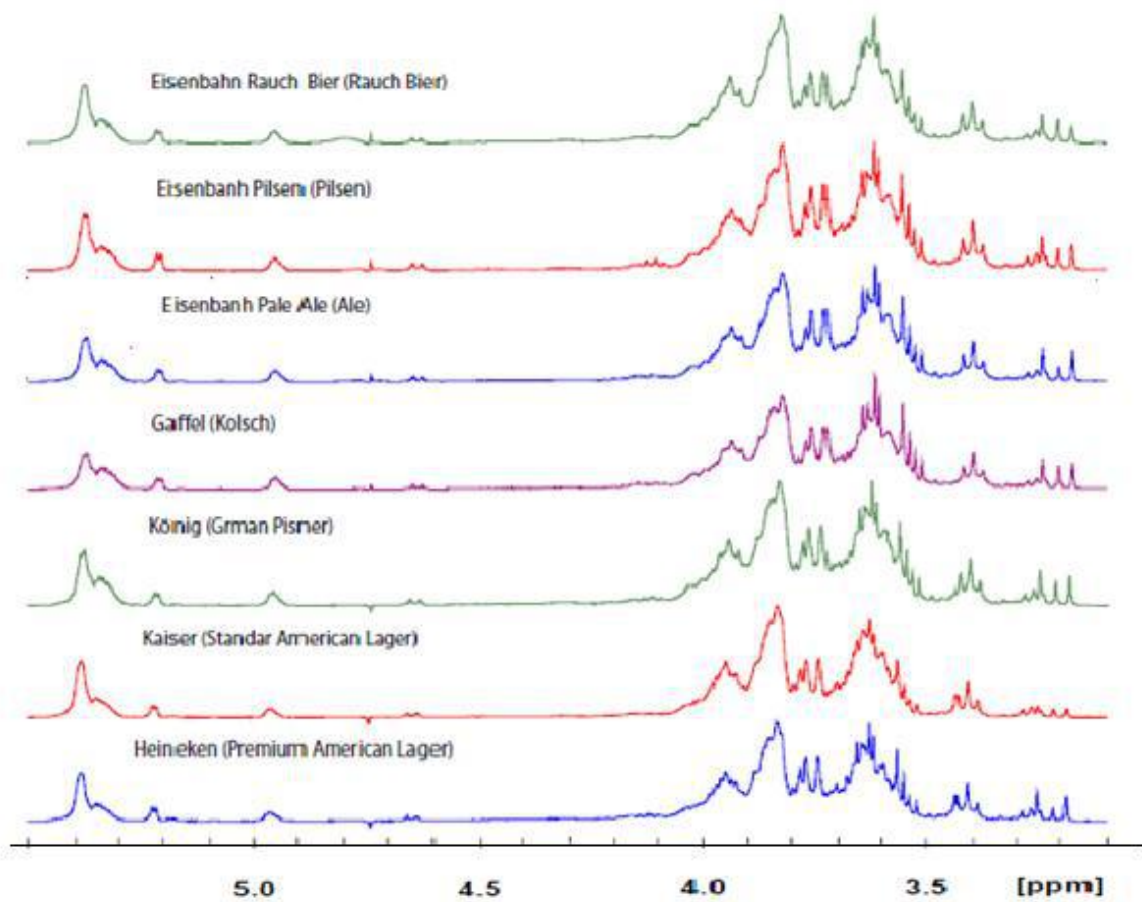


Figura 13: Espectros de RMN de diferentes estilos de cerveja na faixa dos açúcares.

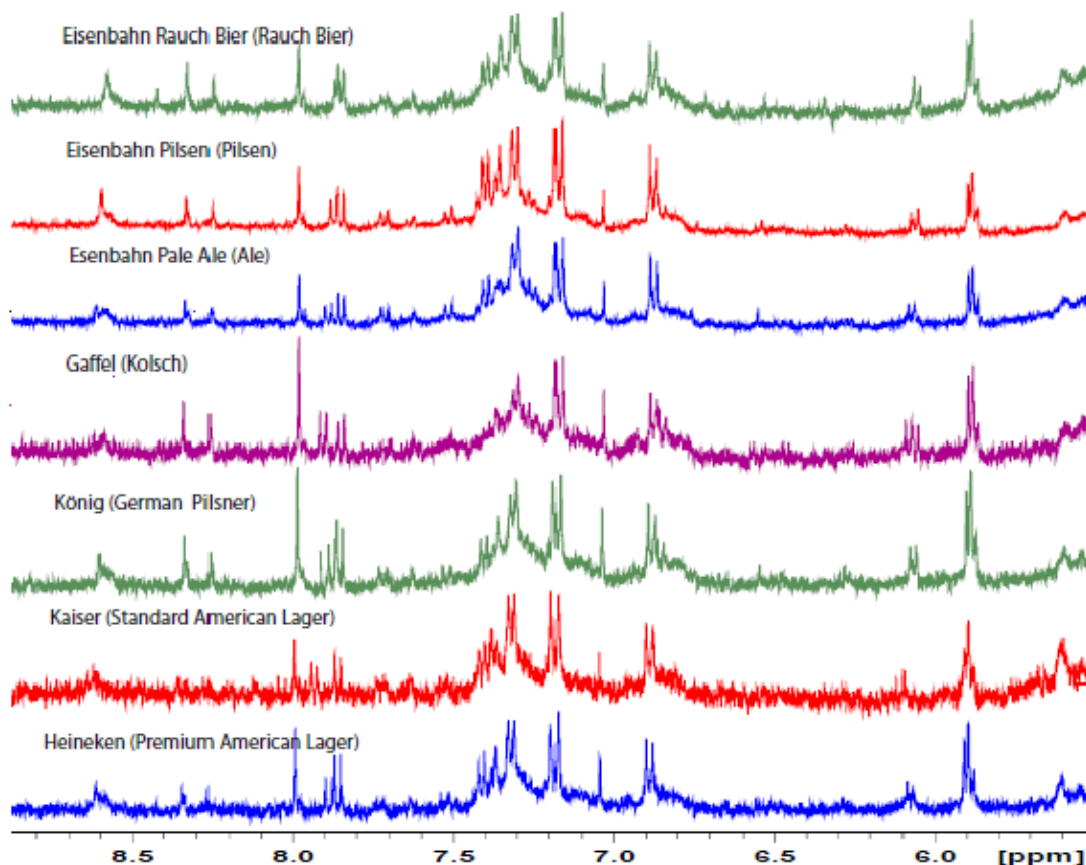


Figura 14: Espectros de RMN de diferentes estilos de cerveja na faixa dos aromáticos.

Como visualmente, a análise das figuras 12, 13 e 14, não permite encontrar variações que possam ser correlacionadas ao estilo da cerveja, devido não só ao elevado número de sinais, mas também a complexidade de cada um. Portanto, foi necessário usar uma técnica multivariada de análise na tentativa de discriminar os estilos de cerveja, usando os espectros apresentados no anexo B. No estudo em questão utilizou-se a técnica conhecida como ACP.

5.3 Análise por Componentes Principais (ACP) dos espectros de RMN

Com o objetivo de procurar as principais características dos estilos de cervejas, foi aplicada a ACP. Para a ACP, foram construídas matrizes dos espectros das amostras. Foram excluídos os sinais da água (4,77 ppm) e do etanol (1,17 e 3,65 ppm) e o restante dos espectros foi subdividido em três faixas:

- Faixa 1: sinais de 0,5 a 3,1 ppm , que representa a região dos alifáticos;
- Faixa 2: sinais de 3,1 a 5,5 pmm, representando a região dos açúcares;
- Faixa 3: sinais de 5,5 a 9,0 ppm, considerada a faixa dos aromáticos.

Foi realizada a análise por ACP dos espectros de RMN dos extratos das cervejas em cada uma das regiões de estudo. Isto é, região dos alifáticos, região dos açúcares e região dos aromáticos. Cada uma delas será analisada separadamente a seguir.

Análise por ACP da região dos alifáticos:

A figura 15 mostra a aplicação da ACP na discriminação das cervejas do estilo Rauch Bier (Eisenbahn Rauch Bier), SAL (Brahma), PAL (Heineken e Stella Artois), Pilsen (Eisenbahn Pilsen), GP (Warsteiner, König e Bitburger) e Kölsch (Eisenbahn Kölsch).

Conforme a figura 15A observa-se que todas as amostras estão dentro do limite de confiabilidade do modelo.

Na figura 15B nota-se que em geral as amostras não estão equidistantes da linha que representa o modelo, indicando que o modelo não representa as amostras de forma equilibrada.

Na figura 15C, o componente principal destacado em azul indica que 95% ou mais da variância do modelo foi explicada. Assim, nesta sub-região, verifica-se que três componentes principais seriam suficientes para explicar praticamente toda a variância dos dados. Neste caso em particular, o próprio programa Amix informou que os 3 CP's indicam explicam 96,27% da variância do modelo.

A figura 15D exibe as cervejas de diferentes estilos, cada estilo representado por uma cor. Nas figuras que mostram os gráficos de CP1 x CP2 nota-se que os estilos de cervejas, marcados em cores diferentes, estão bem separados. Isso indica que estes estilos possuem em comum algumas substâncias características. A figura 15D indica quais os deslocamentos químicos nos *loadings* explicam a separação entre os CP's na figura. Esta sub-região da figura D foi ampliada no anexo C. Cada ponto dos *loadings* indica o deslocamento químico responsável pela discriminação das cervejas na combinação de diferentes CP's.

No gráfico CP1 x CP2 da ACP da figura 15 nota-se que as cervejas do estilo PAL, SAL, Rauch Bier e Pale Ale foram bem discriminados na região dos alifáticos. Entretanto, uma cerveja do estilo Kölsch, em marrom, encontra-se no mesmo grupo de cervejas do estilo GP, em laranja.

Analisando os deslocamentos químicos das substâncias nos pontos dos *loadings* no CP1 x CP2, na figura E, apresentada de forma completa do apêndice B e indicados pelas figuras com borbas em verdes, observou-se que os compostos químicos relevantes para esta diferenciação ácido pirúvico (δ 2,35 ppm), prolina (δ 2,06 ppm), ácido γ - Aminobutírico (GABA) (δ 1,92 ppm), isobutanol (δ 0,87 e 1,73 ppm) e leucina (δ 0,94 ppm).

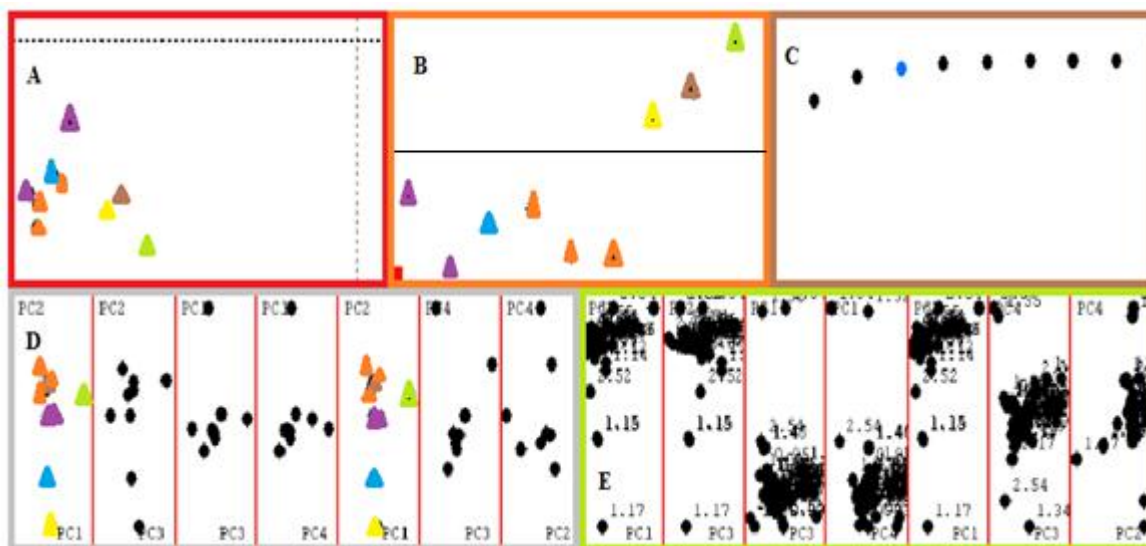


Figura 15: Gráfico da ACP na faixa dos alifáticos. Em amarelo está representada a cerveja do estilo Rauch Bier (Eisenbenh Rauch Bier). Em azul está representada a cerveja do estilo SAL (Brahma). Em roxo estão indicadas as cervejas do estilo PAL (Heineken e Stella Artois). Em verde está indicada a cerveja do estilo Pilsen (Eisenbahn Pilsen). Em laranja estão representadas as cervejas do estilo GP (Warsteiner, König e Bitburger). Em marrom está indicada a cerveja do estilo Kölsch (Eisenbahn Kölsch).

Análise por ACP da região dos açúcares:

A figura 16 mostra a aplicação da ACP na discriminação das cervejas do estilo SAL (Antactica, Antarctica sub-zero e Kaiser), Pale Ale (Eisenbahn Pale Ale), GP (König e DAB) e PAL (Duff Beer e Stella Artois).

Da mesma forma que o observada para a região dos alifáticos, todas as amostras mostradas na figura 16A para a região dos açúcares, estão dentro do limite de confiabilidade do modelo.

A figura 16B mostra que as amostras estão equidistantes da linha horizontal que representa o modelo, indicando assim que o modelo representa as amostras de forma equilibrada.

Na figura 16C, o componente principal destacado em azul indica que 95% ou mais da variância do modelo foi explicada. O programa Amix informou que exatamente quatro componentes principais explicam cerca de 96,84% da variância do modelo.

Na figura 16D observa-se que as cervejas do estilo SAL, em azul, foram separadas das restantes, e agrupadas no CP3 x CP4. Já na combinação CP1 x CP3, as cervejas do estilo GP, em laranja, assim como cerveja do estilo Pale Ale, em cinza. As cervejas do estilo PAL, em roxo, ficaram separados em dois subgrupos, tanto no CP1 x CP3 como no CP3 x CP4.

A figura 16E mostrou quais foram os deslocamentos químicos responsáveis por esta diferenciação. Nos deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* nos CP1 x CP3 e CP3 x CP4 na figura 16E, encontrados no apêndice C nas figuras com bordas verdes, verificou-se que as substâncias responsáveis pela diferenciação dos estilos SAL, GP e Pale Ale foram alanina (δ 3,77 ppm), isoleucina (δ 3,64 ppm), malto-oligossacarídeos (δ 4,64 e 5,22 ppm), prolina (δ 3,41 ppm) e propanol (3,54 ppm). A cerveja do estilo Pale Ale, pertencente ao tipo *Ale*, possui fermentação diferente das outras cervejas, cujo tipo de fermentação é *Lager*. Esta diferença é explicada no deslocamento químico dos malto-oligossacarídeos nos *loadings* analisados.

Sabe-se que a principal fonte de açúcares na cerveja é o malte e o tipo de fermentação utilizado no processo cervejeiro determina os açúcares presentes na cerveja.

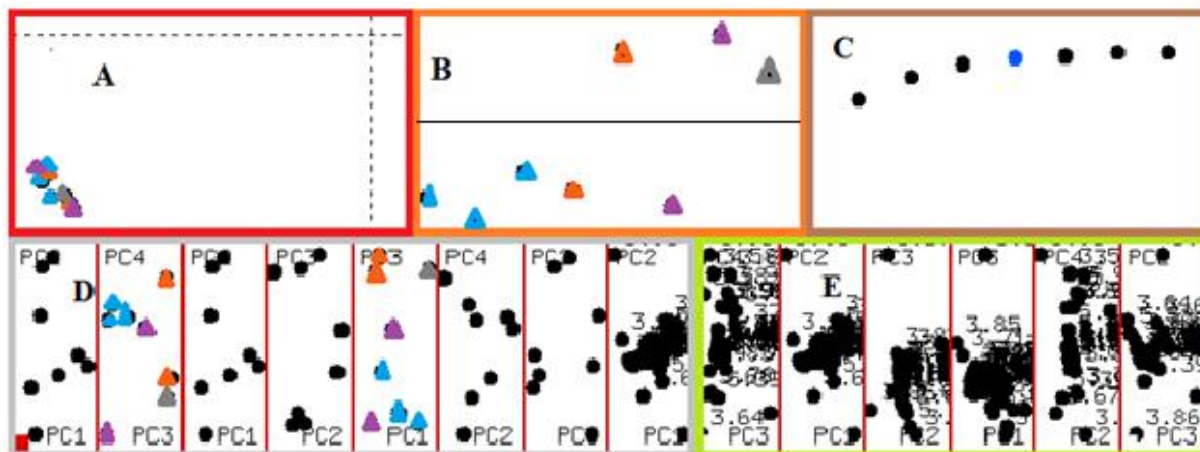


Figura 16: Gráfico de ACP na região dos açúcares. Em azul estão indicadas as cervejas do estilo SAL: Antactica, Antarctica sub-zero e Kaiser. Em cinza está indicada a cerveja do estilo Pale Ale: Eisenbahn Pale Ale. Em laranja estão representadas as cervejas do estilo GP: König e DAB. Em roxo estão representadas as cervejas do estilo PAL: Duff Beer e Stella Artois.

A figura 17 mostra a ACP na discriminação das cervejas do estilo SAL (Antarctica e Skol), GP (DAB, Fürsten e Werner), Kölsch (Eisenbahn Kölsch) e Pale Ale (Eisenbahn Pale Ale).

Na figura 17A, todas as amostras mostradas estão dentro do limite de confiabilidade do modelo.

Na figura 17B observa-se que o modelo foi bem descrito uma vez as amostras estão equidistantes da descrição do modelo.

A figura 17C aponta que quatro componentes principais explicam mais de 95% da variância do modelo. O programa Amix mostrou que 98,28% da variância do modelo foi explicada.

A figura 17D, no CP3 x CP4, as cervejas dos estilos SAL, Pale Ale e Kölsch estão bem separadas. Pode-se aferir que na faixa dos açúcares estes estilos possuem características próprias na composição química das cervejas que pertencem a este estilo.

O apêndice D, uma ampliação da figura 17D, mostra os deslocamentos químicos que explicam a diferenciação destes estilos de cerveja.

O apêndice D, no CP4 x CP2 da sub-região E, nos mostra os deslocamentos químicos das substâncias químicas responsáveis pela discriminação das cervejas dos estilos GP, SAL, Ale e Kölsch: alanina (δ 3,77 ppm), malto-oligossacarídeos (δ 5,22; 4,96, 5,33 e 5,39 ppm), prolina e/ou uridina (δ 4,11 ppm).

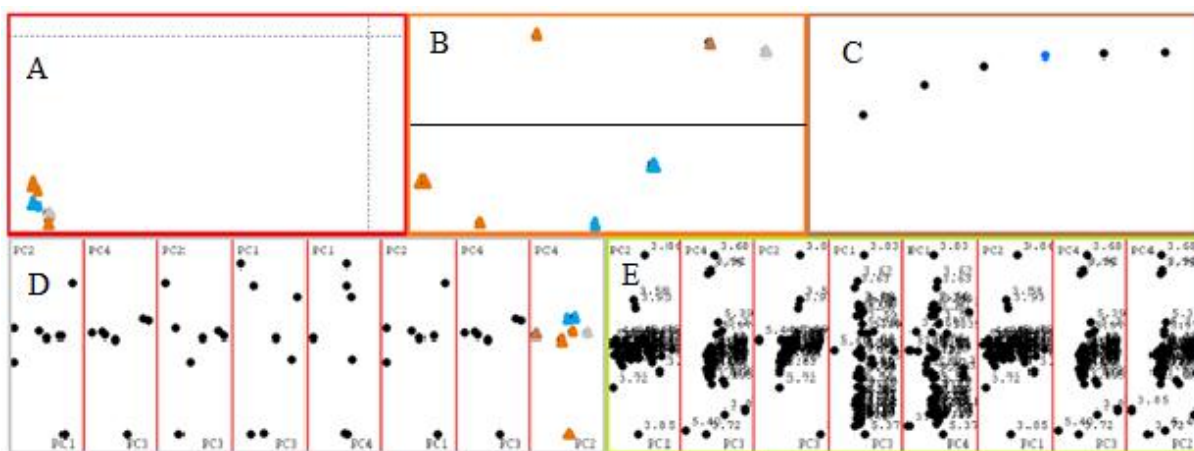


Figura 17: Gráfico de ACP na região dos açúcares. Em azul estão indicadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica e Skol. Em laranja estão representadas as cervejas do estilo

GP: DAB, Fürsten e Werner. Em marrom está indicada a cerveja do estilo Kölsch: Eisenbah Kölsch. Em cinza está representada a cerveja do estilo Pale Ale: Eisenbah Pale Ale.

Análise por ACP da região dos aromáticos:

A figura 18 mostra a ACP das cervejas do estilo SAL (Devassa, Schin, Kaiser e Antarctica) e PAL (Becks, Duff Beer, Heineken e Stella Artois).

Na figura 18A todas as amostras mostradas estão dentro do limite de confiabilidade do modelo.

A figura 18B mostra que as amostras não estão equidistantes da linha que representa o modelo. Portanto, o modelo não representa as amostras de forma equilibrada.

Na figura 18C nota-se que cinco componentes principais explicam quase que a totalidade da variância do modelo. O programa Amix mostrou que estes CP somam 95,43 % da variância.

Na figura 18D, na combinação de CP3 x CP4, é possível ver os estilos de cervejas SAL (em azul) e PAL (em roxo) bem diferenciados. As figuras do apêndice E ampliam os deslocamentos químicos da sub-região E, e assim visualiza-se quais deslocamentos foram relevantes para esta separação.

Pesquisou-se os pontos dos *loadings*, cujos deslocamentos químicos são mostrados no CP3 x CP4 (apêndice E), e identificou-se que as substâncias citidina (δ 6,09 ppm), fenilalanina (δ 7,31 e 7,41 ppm), tirosina/ tirosol (δ 6,81; 7,11 e 6,88 ppm) e triptofano (δ 7,15 e 7,24 ppm) foram responsáveis pela diferenciação.

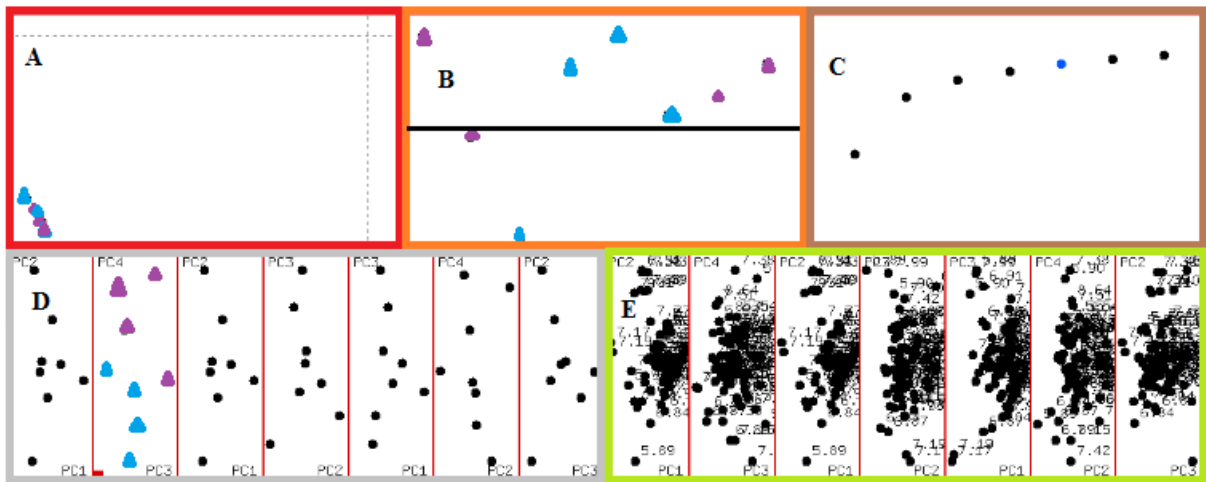


Figura 18: Gráfico de ACP na região dos aromáticos. Em azul estão representadas as cervejas do estilo SAL: Devassa, Schin, Kaiser e Antarctica. Em roxo estão representadas as cervejas do estilo PAL: Becks, Duff Beer, Heineken e Stella Artois.

A figura 19 mostra a ACP na discriminação das cervejas do estilo SAL (Antarctica, Devassa, Kaiser e Schin), Pale Ale (Eisenbahn Pale Ale), Kölsch (Gäffel), GP (König e Werner).

Na figura 19A, todas as amostras mostradas estão dentro do limite de confiabilidade do modelo.

Na figura 19B verifica-se que as amostras não estão equidistantes da linha que representa o modelo. Logo, o modelo não representa as amostras de forma equilibrada.

Na figura 19C nota-se que 95,38% ou mais da variância do modelo é explicada por apenas dois componentes principais. O programa Amix mostrou que 95,38% da variância é explicada.

Na figura 19D, no CP1 x CP3, observa-se que os estilos de cerveja SAL e Pale Ale, representadas em azul e cinza, foram bem discriminados pelo PCA. Além disso, no CP1 x CP3, as cervejas pertencentes ao estilo GP e Kölsch, representadas em laranja e marrom, também se destacam. Nesta combinação de CP's, a proximidade destas duas últimas poderia parecer que elas têm alguma característica em comum. No entanto, o processo fermentação de ambos os estilos são diferentes, além do seu amargor.

As figuras do apêndice F ampliam a figura 19E, mostrando assim quais deslocamentos químicos foram responsáveis por esta variação. O apêndice F, no CP1 x CP3 da sub-região E,

mostra o deslocamento químico das substâncias adenosina/ inosina (δ 8,35 ppm), citidina (δ 7,91 ppm), polifenóis (δ 6,84 ppm), tirosina (δ 7,11 e 7,18 ppm), triptofano (δ 7,50 ppm) e uridina (δ 5,88 ppm) que foram as substâncias importantes nesta diferenciação.

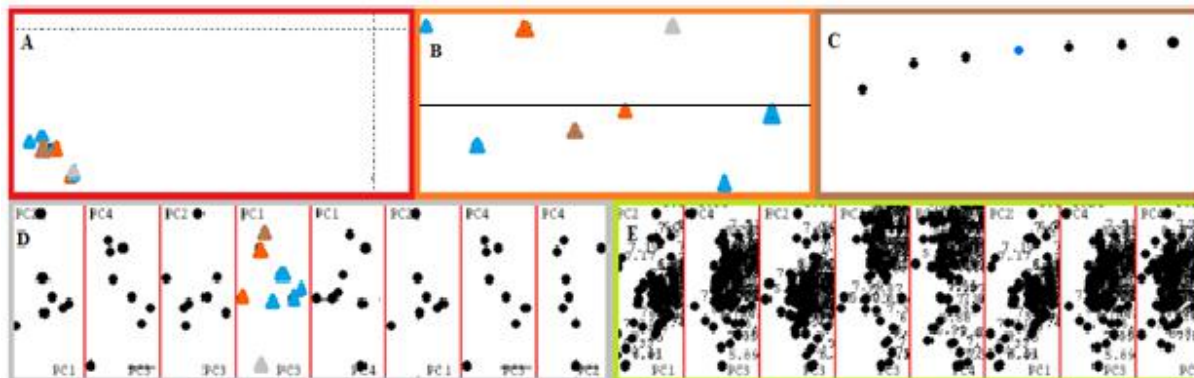


Figura 19: Gráfico de ACP na região dos aromáticos. Em azul estão representadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica, Devassa, Kaiser e Schin. Em cinza está representada a cerveja do estilo Pale Ale: Eisenbahn Pale Ale. Em marrom está representada a cerveja do estilo Kölsch: Gäffel. Em laranja estão representadas as cervejas do estilo GP: König e Werner.

A figura 20 mostra a ACP das cervejas do estilo SAL (Schin, Budweiser, Brahma e Devassa), Kölsch (Gäffel e Eisenbanh Kölsch), GP (Bitburger, DAB e Fürsten) e PAL (Duff Beer).

A figura 20A mostra que todas as amostras mostradas estão no limite de confiabilidade do modelo.

A figura 20B mostra que o modelo não descreve bem as amostras já que estas não estão equidistantes da linha que representa o modelo. Assim, o modelo não representa as amostras de forma equilibrada.

Na figura 20C observa-se que com quatro componentes principais a maior parte da variância (> 95%) já pode ser explicada. Neste caso em particular, o programa AMIX informou que quatro componentes principais descrevem 95,18% da variância total.

Nas combinações CP1 x CP2 e CP1 x CP3 da figura 20D observa-se que as cervejas do estilo SAL (em azul) foram separadas das restantes, mas não agrupadas. Já as cervejas do estilo GP (em laranja) tendem a se agrupar. Já as cervejas do estilo Kölsch (em marrom) foram diferenciadas no CP1 x CP3 e CP2 x CP3.

As figuras do apêndice G exibem diversos deslocamentos químicos da figura 20E ampliados que foram responsáveis pela variação. Neste anexo observou-se que o deslocamento químico das substâncias responsáveis pelas diferenciações, nos CP1 x CP3 e CP2 x CP3, foram adenosina/ inosina (δ 6,06; 8,27 e 8,35 ppm), citidina (δ 7,92 ppm), polifenóis (δ 7,50 ppm), tirosina/ tirosol (δ 7,18 ppm), triptofano (δ 7,50 ppm), citidina (δ 6,09 ppm) e uridina (δ 5,88 ppm). No mesmo anexo, notou-se através de deslocamentos químicos que os compostos responsáveis pela diferenciação no CP2 x CP1 foram fenilalanina (δ 7,31 e 7,41 ppm), tirosol/tirosina (δ 6,89 ppm), triptofano (δ 7,14 ppm), e adenosina/inosina (δ 8,27 e 8,35 ppm).

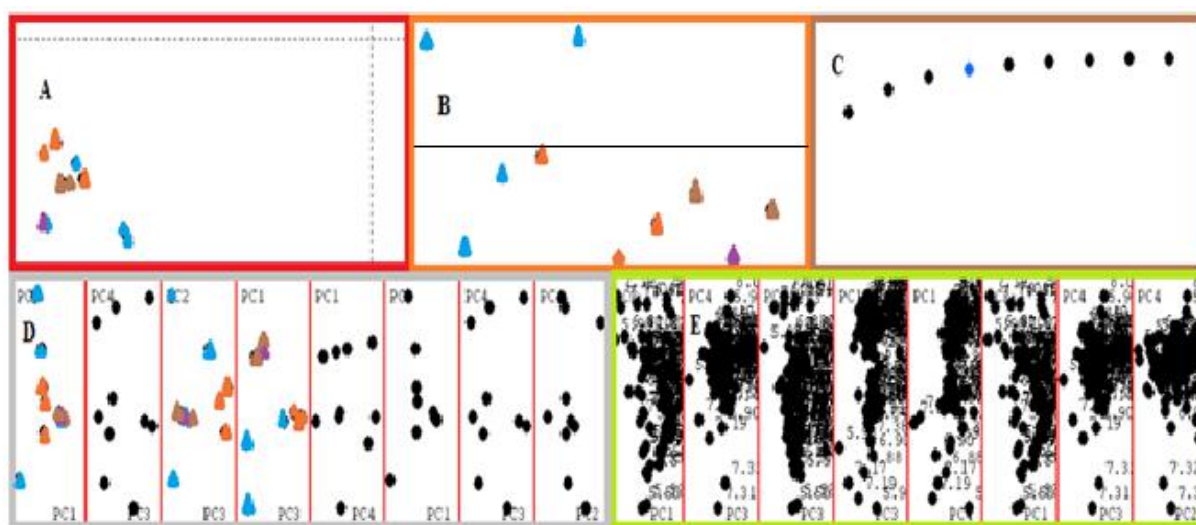


Figura 20: Gráfico da ACP na região dos aromáticos. Em azul estão indicadas as cervejas do estilo SAL: Schin, Budweiser, Brahma e Devassa. Em marro estão representadas as cervejas do estilo Kölsch: Gäffel e Eisenbah Kölsch. Em laranja estão indicadas as cervejas do estilo GP: Bitburger, DAB e Fürsten. Em roxo estão representadas as cervejas do estilo PAL: Duff Beer.

A figura 21 mostra a ACP na discriminação das cervejas do estilo GP (Bitburger, Werner e König), SAL (Antarctica, Kaiser, Schin e Devassa), Kölsch (Eisenbahn Kölsch) e Rauch Bier (Eisenbahn Rauch Bier).

A figura 21A, exibe todas as amostras dentro do limite de confiabilidade do modelo.

A figura 21B mostra que as amostras não estão equidistantes da linha que representa o modelo. Logo, o modelo não representa as amostras de forma equilibrada.

Na figura 21C nota-se que com seis componentes principais 95% ou mais da variância é explicada. Nesta caso, o programa Amix mostrou que cerca de 96,99% da variância do modelo foi explicada por estes componentes principais.

Na figura 21D, no CP1 x CP3, visualiza-se que as cervejas dos estilos SAL (em azul) e GP (em laranja), foram bem separadas, assim como a cerveja do estilo Kölsch (em amarelo). Entretanto, uma cerveja do estilo GP, em laranja, está próxima de outra cerveja pertencente ao estilo Kölsch, em marrom. Pode-se aferir que há alguma similaridade na composição química destas cervejas, em relação a substâncias que possuem deslocamentos químicos na faixa dos aromáticos.

A figura 21E apresenta os deslocamentos químicos importantes para a separação dos estilos GP e SAL. Estes deslocamentos podem ser melhores visualizados no apêndice H, que mostra os deslocamentos químicos mais claramente do CP1 x CP3. Estes deslocamentos indicam que as substâncias químicas relevantes para esta diferenciação foram tirosina/tirosol (δ 6,88 e 7,15 ppm), fenilalanina (δ 7,31 e 7,37 ppm) e adenosina/ inosina (δ 8,35 ppm).

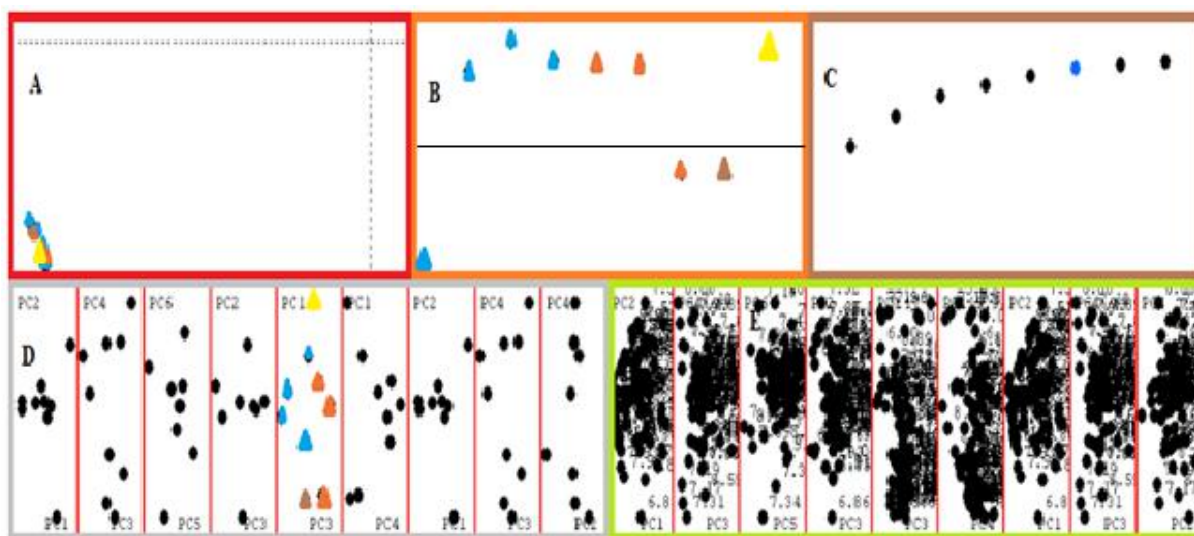


Figura 21: Gráfico da ACP na região dos aromáticos. Em laranja estão indicadas as cervejas do estilo GP: Bitburger, Werner e König. Em azul estão apresentadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica, Kaiser, Schin e Devassa. Em marrom está representada a cerveja do estilo Kölsch: Eisenbahn Kölsch. Em amarelo está indicada a cerveja do estilo Rauch Bier: Eisenbahn Rauch Bier.

A figura 22 mostra a aplicação da ACP na discriminação das cervejas do estilo GP (König e Bitburger), SAL (Antarctica, Schin, Brahma e Kaiser) e PAL (Duff Beer e Becks).

A figura 22A mostra que todas as amostras estão dentro do limite de confiabilidade do modelo.

Na figura 22B verifica-se que as amostras não estão equidistantes da linha que representa o modelo. Assim, o modelo não representa as amostras de forma equilibrada.

Na figura 22C verifica-se que cinco componentes principais explicam a maior parte da variância. O programa Amix indicou que eles representam cerca de 97,83% da variância do modelo.

A figura 22D exibe, nos CP1 x CP2 e CP2 x CP3, os estilos GP (em laranja), SAL (em azul) e PAL (em roxo), sendo que as cervejas do estilo GP foram bem separadas.

Na figura 22E encontram-se os deslocamentos químicos significativos para a separação observada na figura 22D. No apêndice I, nos CP1 x CP2 e CP2 x CP3 da sub-região E, pode-se ver mais claramente os deslocamentos químicos referenciados anteriormente. Eles estão correlacionados as substâncias que foram relevantes nesta discriminação: adenosina/inosina (δ 6,06 e 8,35 ppm), fenilalanina (δ 7,31 e 7,37 ppm), triptofano (δ 7,15 ppm) e uridina (δ 7,86 ppm).

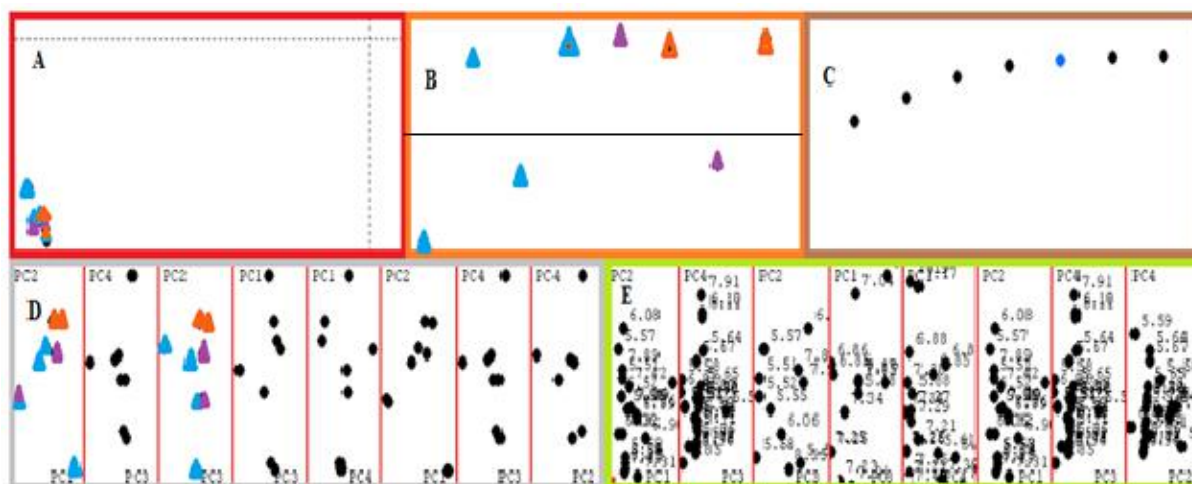


Figura 22: Gráfico da ACP na região dos aromáticos. Em laranja estão indicadas as cervejas do estilo GP: König e Bitburger. Em azul estão representadas as cervejas do estilo SAL: Antarctica, Schin, Brahma e Kaiser. Em roxo estão indicadas as cervejas do estilo PAL: Duff Beer e Becks.

Conforme já explicitado na introdução, cervejas contêm proteínas que provêm especialmente do malte da cevada. As proteínas maiores são precipitadas e removidas durante

a fervura do mosto, enquanto que a maioria dos aminoácidos livres no mosto é absorvida pela levedura durante a fermentação.

Prolina é o aminoácido mais abundante presente na cerveja já que ele não é assimilado pela levedura. Este aminoácido foi identificado no gráfico de *loadings* de todas as ACP's na faixa dos alifáticos e açúcares, onde cai o deslocamento químico deste aminoácido (δ 2,05, 3,41 e 4,11 ppm). Enquanto que a quantidade de outros aminoácidos muda significativamente com o tipo de cerveja. Logo, é bastante razoável que na diferenciação dos estilos de cervejas diversos aminoácidos foram identificados no deslocamento químico dos *loadings*.

A cerveja tem uma grande quantidade de compostos fenólicos derivados tanto do lúpulo como do malte: tirosol, tirosina, ácido ferúlico, entre outros (BANFORTH, 2000). Assim, dependendo da quantidade e tipo de lúpulo e malte usados na fabricação da cerveja, a concentração destes compostos fenólicos varia de acordo com o estilo da cerveja. Desta forma, a ACP tentou aferir quais são as substâncias químicas responsáveis pela diferenciação dos estilos de cervejas.

A classificação das cervejas usando açúcares, alifáticos e aromáticos não é restrita porque a fermentação afeta primeiramente a composição dos açúcares no produto final e dos alifáticos, que são produtos de degradação. Já a parte dos aromáticos em geral passa, por exemplo, do lúpulo diretamente para a cerveja (LERMUSIEAU *et al*, 2001).

Assim, as diferentes partes dos espectros sofrem influências diferentes durante a fermentação: a parte aromática sobrevive ou sofre degradação química por temperatura, a parte dos açúcares depende da levedura e condições de fermentação, a parte dos alifáticos depende das condições de fermentação e de compostos inertes à fermentação que passam das matérias primas para a cerveja. Em geral a parte aromática é considerada mais importante para o gosto, combinado com os açúcares.

Na ACP na faixa dos alifáticos, na figura 15, no CP1 x CP2 da sub-região D, observa-se que os estilos GP e Kölsch não foram bem separados, formando um único grupo de cervejas. Este resultado ainda é inexplicável porque as cervejas dos estilos GP e Kölsch possuem processos de fermentações completamente diferentes. Conforme já mencionado na fundamentação teórica, as cervejas do estilo Kölsch possuem fermentação híbrida, são produzidas com fermento *ale* e maturadas em temperatura mais característica de *lager*; enquanto que as cervejas GP possuem fermentação *lager*. O resultado da ACP infere que

apesar das cervejas do estilo Kölsch terem sabor de cerveja tipo *Ale*, elas possuem algumas substâncias químicas que lhe conferem as mesmas propriedades de cervejas de fermentação *lager*, como a GP.

A diferença na ACP entre as cervejas do estilo Pale Ale e outros estilos é coerente porque a fermentação *lager* e *ale* são realizadas em condições distintas (SILVA, 2014). Sendo assim, há uma diferença entre a composição química destas cervejas. Isto é visível no PC1 x PC3 da figura 16, ACP na faixa dos açúcares, onde a cerveja Eisenbahn Pale Ale está isolada de outras cervejas. Nesta mesma combinação de CP's notou-se que as cervejas dos estilos SAL e PAL formam um único grupo. Isto indica que estas cervejas possuem o mesmo tipo de fermentação ao serem produzidas, conforme já era esperado. Também observou-se na mesma combinação de CP's que as cervejas do estilo GP foram bem separadas na ACP das cervejas tipo *lager* suaves como PAL e SAL, além da cerveja tipo Ale. Isto é explicado pelo fato de serem adicionados cereais como milho e aveia na produção das cervejas deste estilo antes da etapa da fermentação.

A ACP na faixa dos aromáticos da figura 19 mostra, no CP2 x CP3 da sub-região D, as cervejas do estilo SAL separadas das cervejas do estilo Kölsch, GP e tipo Ale. As cervejas do estilo SAL, diferentemente das cervejas dos estilos Kölsch, GP e tipo Ale, não são fabricadas com lúpulo alemão.

Logo, as diferenças químicas nas cervejas são claramente verificadas para algumas cervejas, e não para outras. Aquelas cervejas cujas classes são claramente identificadas pela análise de ACP podem ser explicadas pela diferença de condições de fermentação e pela diferente composição.

5.4 Aplicação do modelo da ACP obtido através dos espectros de RMN

A partir das discriminações dos estilos de cervejas obtidos no item anterior, foram criados modelos a fim de classificar as cervejas com o estilo a que pertencem. Verificou-se o funcionamento destes modelos usando-se espectros de RMN obtidos a partir de outras cervejas.

5.4.1 ACP na região dos alifáticos

Usou-se o gráfico da ACP da figura 15, página 56, feito com as cervejas Brahma-estilo SAL, Heineken e Stella Artois- estilo PAL, Wärsteiner, König e Bitburger- estilo GP,

Eisenbah Kölsch- estilo Kölsch, Eisenbah Pilsen- estilo Pilsen e Rauch Bier- estilo Rauch Bier, para construir o modelo de classificação na região dos alifáticos.

Validação do modelo para cervejas dos estilos SAL, Pilsen e Kölsch:

Aplicou-se o modelo às cervejas Quilmes-estilo SAL, Bohemia Pilsen- estilo Pilsen e Gäffel- estilo Kölsch, de forma a validá-lo conforme as mostram as figuras 23 e 24. Nestas figuras, as amostras de cerveja usadas na construção do modelo estão em verde e aquelas usadas na validação do modelo, em preto. Nelas, tanto as amostras que foram classificadas como aquelas usadas na construção do modelo estão destacadas e identificadas com o nome da cerveja que representam.

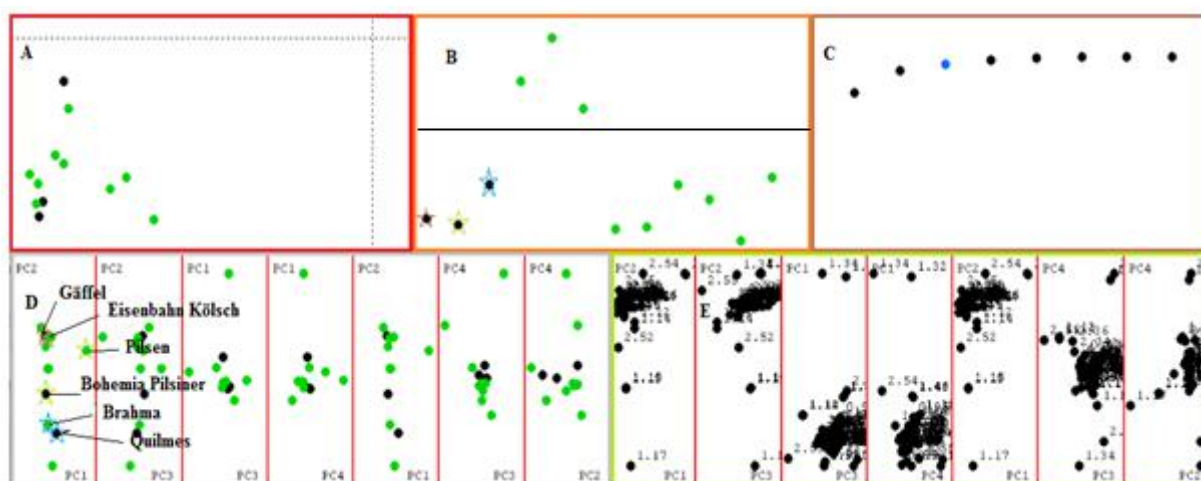


Figura 23: Aplicação do modelo da ACP na região dos alifáticos às cervejas do estilo SAL– Quilmes, Pilsner-Bohemia e Kölsch- Gäffel. Todas as cervejas as quais o modelo foi aplicado estão representadas em preto.

Pode-se perceber que as cervejas Gäffel e Quilmes, no CP1 x CP2, estão próximas a cervejas de mesmo estilo, mostrando a correta classificação das cervejas deste estilo. Já a cerveja Bohemia, não foi corretamente classificada. Isto pode ser aferido a alguma diferença na composição das cervejas Bohemia Pilsiner e Pilsen, que apesar de pertencerem ao mesmo estilo, possuem propriedades químicas diferentes.

Validação do modelo para cervejas do estilo GP:

A figura 24 mostra o resultado da aplicação do modelo as cervejas do estilo GP.

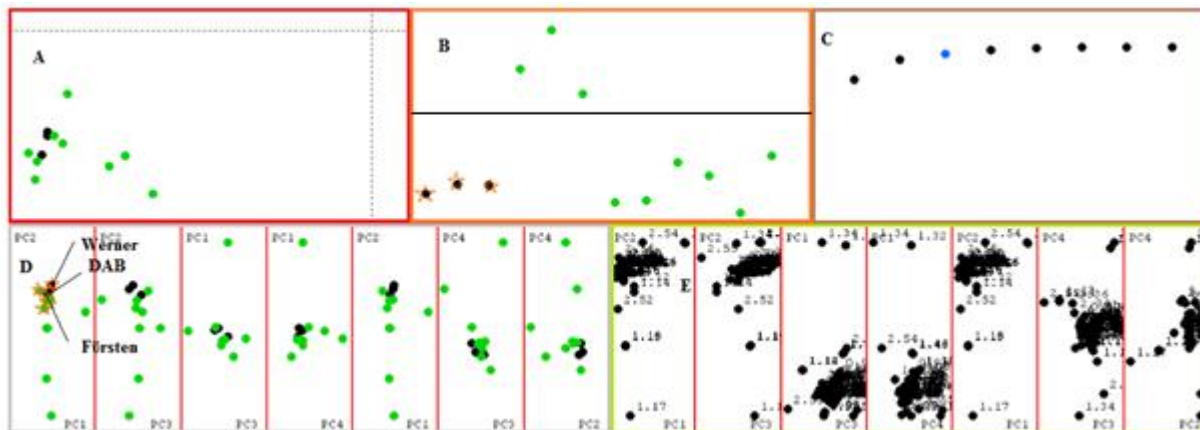


Figura 24: Aplicação do modelo da ACP na região dos alifáticos para as cervejas do estilo GP- DAB, Fürsten e Werner- representadas em preto.

Uma análise desta figura mostra que as três cervejas do estilo GP foram corretamente classificadas no modelo.

A tabela 8 mostra resumidamente o resultado da classificação das cervejas para as quais o modelo foi aplicado.

Tabela 8: Resultado da validação do modelo de ACP na região dos alifáticos.

Modelo: Alifáticos		
Cerveja	Classificação correta	Estilo
DAB	Não	GP
Quilmes	Não	SAL
Werner	Não	GP
Gäffel	Não	K
Fürsten	Não	GP
Bohemia	Não	Pilsen

Os grupos dos componentes principais dos estilos Kölsch e GP estão no mesmo grupo. E os componentes principais que representam as cervejas Gäffel - estilo Kölsch, figura

23, e Werner e DAB - estilo GP, figura 24, caíram exatamente na região do grupo formado pelos estilos aos quais estas cervejas pertencem.

5.4.2 ACP na região dos açúcares

Usou-se o gráfico da ACP da figura 16, página 57, feito com as cervejas Antarctica, Antarctica sub-zero e Kaiser- estilo SAL (em azul), DAB e König- estilo GP (em laranja), Eisenbah Pale Ale- estilo Pale Ale (em cinza), Duff Beer e Stela Artois- estilo PAL (em roxo), para a construir o modelo de classificação na região dos açúcares.

Nas figuras 25 e 26, as amostras de cerveja usadas na construção do modelo estão em verde e aquelas usadas na validação do modelo, em preto. Nestas figuras, tanto as amostras que foram classificados como aquelas usadas na construção do modelo estão destacadas e identificadas com o nome da cerveja que representam.

Validação do modelo para cervejas dos estilos GP e Ale:

Na figura 25, aplicou-se o modelo às cervejas Werner, Bitburger e Fürsten- estilo GP e Colorado- estilo Ale.

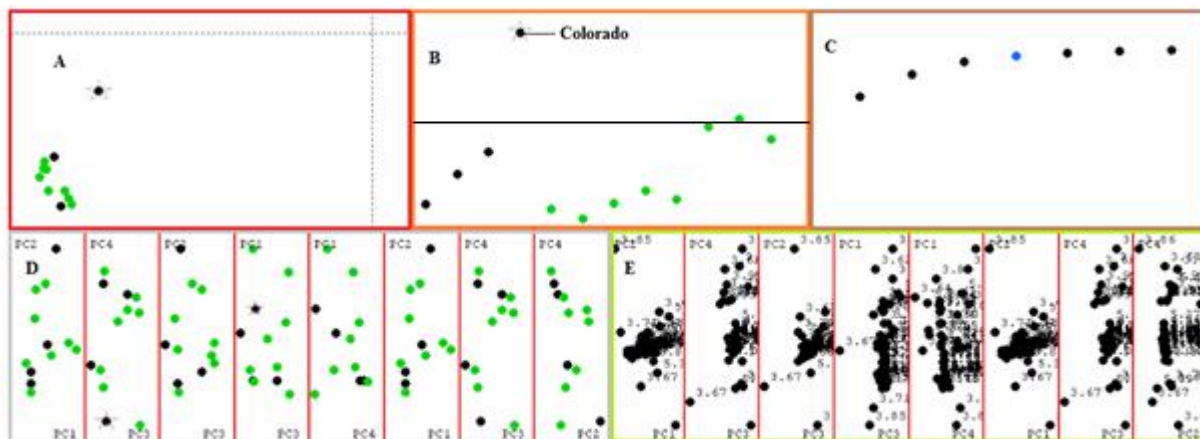


Figura 25: Aplicação do modelo de ACP na região dos açúcares para as cervejas do estilo GP e ALE- todas representadas em preto.

Nota-se que na figura B, a cerveja Colorado do estilo Ale ficou afastada dos componentes principais que definem o modelo. Sendo assim, o modelo representa as amostras de forma desequilibrada. E este modelo não pode ser usado na aplicação do modelo para as cervejas do estilo Ale.

Validação do modelo para cervejas do estilo GP:

A figura 24 mostra o resultado da aplicação do modelo as cervejas do estilo GP.

A amostra que representa a cerveja DAB está exatamente dentro do grupo de cervejas que pertencem ao mesmo estilo. Já as amostras das cervejas Bitburger e Werner estão distantes do grupo cervejas pertencem ao mesmo estilo. Isto significa que modelo consegue classificar bem somente a Fürsten. E pode-se aferir que a cerveja Fürsten possui propriedades químicas semelhantes as das cervejas DAB e König.

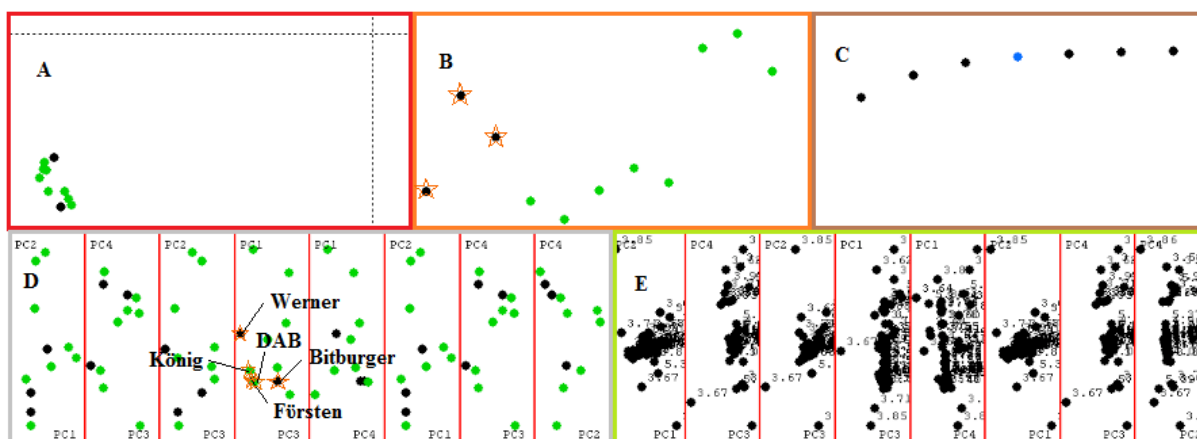


Figura 26: Aplicação do modelo da ACP na região dos açúcares para as cervejas do estilo GP- Werner, Bitburger e Fürsten - todas representadas em preto.

A tabela 9 mostra resumidamente o resultado da classificação das cervejas nas quais o modelo foi aplicado.

Tabela 9: Resultado da aplicação do modelo da ACP na região dos açúcares.

Modelo: Açúcares		
Cerveja	Classificação correta	Estilo
Werner	Não	GP
Bitburger	Não	GP
Fürsten	Sim	GP

O gráfico de ACP na região dos açucares na figura 16, página 57, exibe o estilo SAL- Antartica, Antartica sub-zero e Kaiser, no CP3 x CP4 e os estilos GP- DAB e König - e Pale Ale- Eisenbahn Pale Ale, no CP3 e CP1, bem discriminados.

Na aplicação do modelo, figura 25, a amostra que representa a cerveja Colorado- estilo Pale Ale, ficou afastada daquelas que definem este estilo no modelo na figura B do ACP. Assim, na aplicação do modelo na figura 26, esta cerveja foi excluída.

Além disso, nesta figura 26, observa-se que a cerveja Fürsten foi classificada pelo modelo, uma vez que esta cerveja, no CP1 x CP3, está exatamente na região daquelas que representam as cervejas do estilo GP.

Já as cervejas Werner e Bitburger- estilo GP, não foram classificadas pelo modelo uma vez que estas cervejas estão distantes daquelas que representam o estilo GP.

5.4.3 ACP na região dos aromáticos

Usou-se o gráfico da ACP da figura 18, página 60, feito com as cervejas Antartica, Devassa, Schin e Kaiser- estilo SAL (em azul) e as ceverjas Becks, Duff Beer, Heineken e Stela Artois- estilo PAL (em roxo), para a construir o modelo de classificação na região dos aromáticos. Este modelo de ACP foi denominado Aromáticos I.

Validação do modelo para cervejas do estilo PAL:

Na figura 27, aplicou-se o modelo às cervejas Amstel e Mahou- estilo PAL.

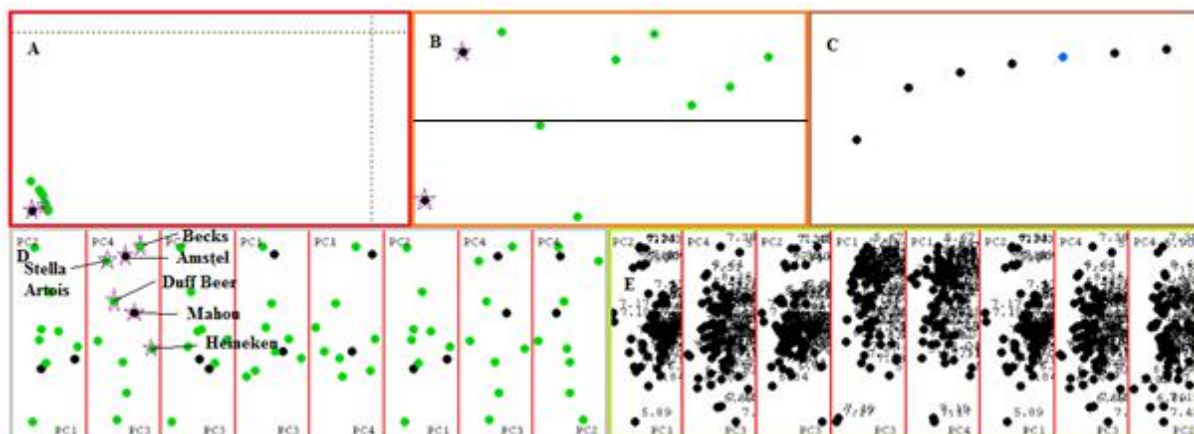


Figura 27: Aplicação do modelo da ACP na região dos aromáticos (modelo Aromáticos I) para as cervejas do estilo PAL- Amstel e Mahou, todas representadas em preto.

As cervejas Amstel e Mahou, em preto, estão dentro do grupo cujas cervejas pertencentes ao mesmo estilo.

Validação do modelo para cervejas do estilo SAL:

A figura 28 apresenta a aplicação do modelo para as cervejas Brahma, Skol e Skol International- estilo SAL. Nas figuras, as amostras usadas na construção do modelo estão em verde e aquelas usadas para validar o modelo estão em preto. Nestas figuras, tanto as amostras que foram classificadas assim como algumas usadas na construção do modelo estão destacadas e identificadas com o nome das cervejas que as representam.

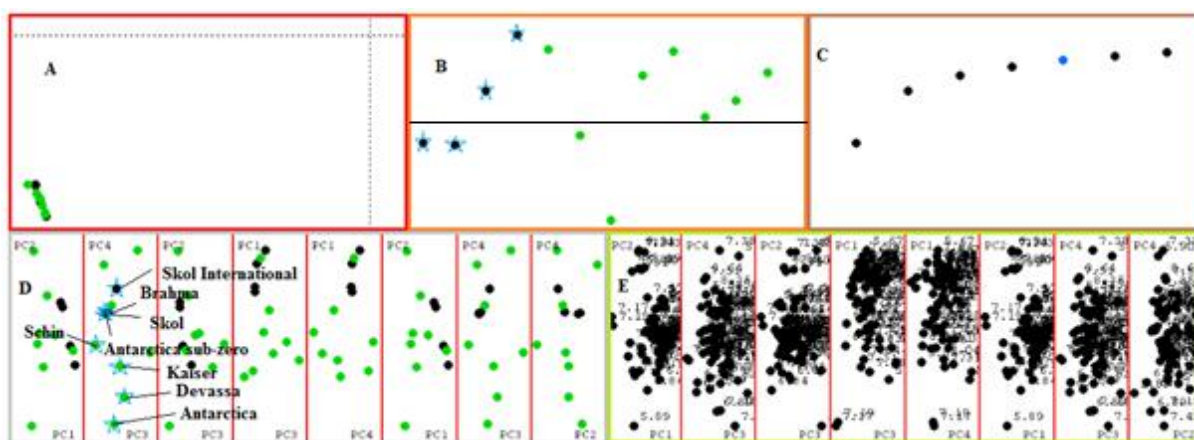


Figura 28: Aplicação do modelo da ACP na região dos aromáticos (modelo Aromáticos I) para as cervejas do estilo SAL: Antarctica sub-zero, Skol, Brahma e Skol International, todas representadas em preto.

As cervejas Antarctica sub- zero, Brahma, Skol e Skol International, estilo SAL, não foram corretamente classificadas no grupo de cervejas do mesmo estilo.

O estilo SAL está bem separado do estilo PAL na figura 18 (CP3 x CP4) e, da mesma forma que para o estilo PAL, o estilo SAL deveria ter sido bem modelado. Pode-se aferir que as cervejas Antarctica sub-zero, Skol, Brahma e Skol International podem possuir propriedades químicas semelhantes às cervejas do estilo PAL, especialmente na composição de substâncias aromáticas.

A tabela 10 mostra, resumidamente, o resultado da classificação das cervejas nas quais o modelo foi aplicado.

Tabela 10: Resultado da aplicação do modelo da ACP na região dos aromáticos: modelo Aromáticos I.

Modelo: Aromáticos I		
Cerveja	Classificação correta	Estilo
Amstel	Sim	PAL
Mahou	Sim	PAL
Antarctica sub- zero	Não	SAL
Skol	Não	SAL
Brahma	Não	SAL
Skol International	Não	SAL

Usou-se o gráfico da ACP da figura 21, página 63, feito com as cervejas König e Werner- estilo GP (em laranja), Antarctica, Devassa, Kaiser e Schin- estilo SAL (em azul), Eisenbah Pale Ale- estilo Pale Ale (em cinza) e Gäffel- estilo Kölsch (em marrom), para a construir o modelo de classificação na região dos aromáticos. Este modelo de ACP foi denominado Aromáticos II.

Validação do modelo para cervejas dos estilos SAL e Kölsch:

A figura 29 apresenta o resultado da aplicação do modelo às cervejas Quilmes- estilo SAL, Colorado- estilo Pale Ale e Eisenbahn Kölsch- estilo Kölsch. As cervejas usadas na construção do modelo estão em verde e aquelas para as quais o modelo foi aplicado estão em preto.

Nesta figura, tanto as amostras de cerveja que foram classificadas como algumas das usadas na construção do modelo, estão destacados e identificados com o nome das cervejas que representam.

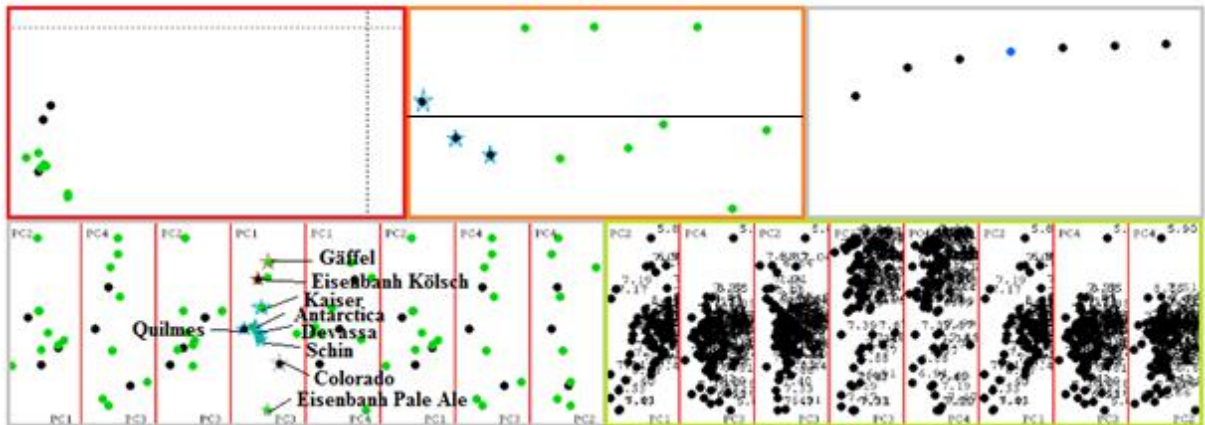


Figura 29: Aplicação do modelo de ACP na região dos aromáticos (modelo Aromáticos II) para as cervejas Quilmes- estilo SAL, Colorado- estilo Pale Ale e Eisenbahn Kölsch- Kölsch, todas representadas em preto.

A cerveja Quilmes está no grupo de cujas cervejas pertencem ao mesmo estilo. O mesmo não pode ser dito da cerveja Eisenbahn Kölsch e da cerveja Colorado que não foram corretamente classificadas nos grupos de cervejas referentes aos seus estilos.

A tabela 11 mostra resumidamente o resultado da classificação das cervejas nas quais o modelo foi aplicado.

Tabela 11: Resultado da aplicação do modelo de ACP Aromáticos II.

Modelo: Aromáticos II		
Cerveja	Classificação correta	Estilo
Quilmes	Sim	SAL
Colorado	Sim	Pale Ale
Eisenbahn Kölsch	Não	K

As cervejas do estilo GP e Kölsch ficaram próximas e muitas vezes formavam um só grupo no ACP, conforme as figuras 15, 19 e 21. Na aplicação do modelo nas figuras 23 e 24, as cervejas dos estilos Kölsch - cerveja Gäffel e GP- cervejas DAB, Fürsten e Werner, ficaram na região na qual as classes destes estilos se confundem. Apesar de poder haver semelhança química entre estes estilos na discriminação por ACP, estes estilos são totalmente diferentes na matéria-prima, tipo de fermentação e sabor.

É importante lembrar que as cervejas do estilo Kölsch são híbridas porque são feitas com fermento *ale* e maturadas em temperatura mais característica de *lager*. E são feitas somente com cevada, lúpulo, água e levedura (KÖLSCH Profile, 2014). Já o estilo GP pertence ao tipo Pilsen, cuja fermentação é *lager*. As cervejas do estilo GP são fabricadas com lúpulos nobres alemães (SILVA, 2014; BEER Glossary, 2014).

O modelo Alifáticos, visualizado na tabela 8, não classificou as cervejas de forma correta. Contudo, deve-se levar em consideração que se a faixa dos alifáticos está relacionada a compostos provenientes da fermentação, todas as cervejas testadas na validação do modelo foram produzidas pela fermentação tipo *lager*, exceto a única cerveja estilo Kölsch, cuja fermentação é híbrida, esta foi a única cerveja que não foi classificada pelo modelo analisando somente o tipo de fermentação.

As Diretrizes de Estilo para Cerveja do *Beer Judge Certification Program* (BJCP) classificam cervejas do estilo PAL aquelas que apresentem aroma de malte de baixo a médio-baixo e o aroma de lúpulo pode variar de muito baixo até médio-baixo, enquanto que as cervejas do estilo SAL possuem pouco a nenhum aroma de malte e o aroma de lúpulo pode variar de nenhum até uma presença leve (BJCP, 2008). Além disso, a legislação que classifica ambos os estilos, PAL e SAL, como cervejas do tipo *lager* (CONSTITUIÇÃO, 1988). Na aplicação do modelo na faixa dos aromáticos, as cervejas do estilo PAL foram classificadas pelo modelo, consoante a figura 29, enquanto que as cervejas do estilo SAL não, de acordo com a figura 29. Conforme já explicitado no texto, a classificação de cervejas na faixa dos aromáticos implica na diferenciação das cervejas pelo teor de lúpulo. Pela classificação de estilos segundo as Diretrizes de Estilo para Cerveja do BJCP, as cervejas do estilo PAL possuem maior quantidade de lúpulo do que as cervejas do estilo SAL, embora esta quantidade não seja expressa em números.

As cervejas Beck's e Stella Artois pertencem ao grupo AB Inbev, a Duff Beer ao grupo Saint Bier e a Heineken ao grupo Heineken. Por sua vez as cervejas usadas na validação do modelo PAL na faixa dos aromáticos, Amstel e Mahou, pertencem às cervejarias, respectivamente, Amstel e Mahou. As cervejas PAL de diferentes fabricantes analisadas foram bem agrupadas e classificadas pelo modelo, aferindo assim que a quantidade de lúpulo adicionado nelas é semelhante. As cervejas Devassa e Schin são fabricadas pela Schincariol, a Kaiser pela Heineken e a Antartica pela AB Inbev. Também, as cervejas usadas na validação do modelo SAL na faixa dos aromáticos, Antartica sub-zero, Skol e

Brahma pertencem ao grupo AB Inbev e as cerveja Skol International à Brau Union Österreich. O fato das cervejas Antarctica sub-zero, Skol e Brahma estarem na ACP no grupo de cervejas PAL afere que não existe muita diferença em relação ao teor de lúpulo adicionado as cervejas SAL e PAL pela fabricante AB Inbev. As cervejas Heineken (PAL) Kaiser (SAL) estão em grupos distintos na ACP. Isso mostra que a cervejaria Heineken produz cervejas com teores de lúpulo significativamente diferentes, sendo as cervejas dos estilos SAL e PAL bem distintas. Portanto, isto explica o fato das cervejas Heineken e Stella Artois, ambas PAL, possuírem sabores diferentes.

O teste de validação das cervejas Quilmes- estilo SAL e Colorado- tipo Ale no modelo Aromáticos II, na tabela 11, mostrou que estas cervejas foram classificadas corretamente pelo modelo. Lembrando que a faixa dos aromáticos está relacionada ao teor de lúpulo nas cervejas, estas cervejas possuem características bem distintas. As Diretrizes de Estilo para Cerveja do BJCP classificam cervejas do estilo Pale Ale como cervejas cujo aroma de lúpulo são moderadamente alto a moderadamente baixos e pode ser usados uma variedade de lúpulos, enquanto nas cervejas do estilo SAL o aroma de lúpulo pode variar de nenhum até uma presença leve (BJCP, 2008).

Capítulo 6: Conclusão

A análise dos espectros de RMN e discriminação por ACP mostraram que as cervejas pertencentes a um mesmo estilo podem diferir em relação a sua composição. Portanto, as diferenças químicas nas cervejas são claramente verificadas para algumas cervejas, e não para outras. Aquelas cervejas cujas classes são claramente identificadas pela análise de ACP podem ser explicadas pela diferença de condições de fermentação e pela diferente composição.

A classificação das cervejas mostrou que os modelos de ACP não funcionaram para as cervejas dos estilos GP e Kölsch na região dos alifáticos. Mas o modelo foi eficiente na classificação dos estilos Pale Ale e Kölsch na região dos aromáticos. Isto permite dizer que, com alguma cautela, é possível discriminar os estilos de cerveja usando esta técnica Quimiométrica. E ainda pode-se aferir o tipo de fermentação e o teor de lúpulo da cerveja pela classificação do modelo.

As cervejas PAL de diferentes fabricantes foram bem agrupadas e classificadas pelo modelo. Afere-se que a quantidade de lúpulo adicionados nelas é semelhante.

As cervejas Antarctica sub-zero, Skol e Brahma foram classificadas no grupo PAL do modelo. Pode-se afirmar com cautela que não existe muita diferença de lúpulo adicionado as cervejas PAL e SAL pelo fabricante AB Inbev.

As cervejas Heineken (PAL) e Kaiser (SAL) estão em grupos distintos. Isso indica que a cervejaria Heineken produz cervejas com teor de lúpulo significativamente diferente.

Os resultados permitem pensar no uso de ACP e RMN como estratégia de controle de qualidade de cervejas, além de seu potencial uso forense.

Capítulo 7: Propostas de trabalhos futuros

Muito pode ser proposto a partir dos resultados obtidos. Algumas das muitas possibilidades podem ser:

- O aumento do número de cervejas da amostragem a fim de consolidar a quantidade de informação para cada estilo e de se discriminar outras cervejas.
- Uso de outras técnicas analíticas para obter mais informações sobre a composição dos extratos das cervejas, como por exemplo a cromatografia.
- Aplicação de outras técnicas Quimiométricas, como por exemplo, *Alternative Least Squares* (ALS) para discriminar os estilos de cerveja.
- Uma nova classificação dos estilos de cervejas baseada em análises do produto pronto, já que atualmente classifica-se a cerveja pelo método de produção.

Referências Bibliográficas

- ALVES, J. **Aplicação de técnicas de RMN em solução ao estudo de sistemas químicos e biológicos**. 2010. 73 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Química e Bioquímica. Faculdade de Ciências. Universidade de Lisboa. 2010. p. 4-8
- ATKINS, P.; PAULA, J. 1978. **Physical – Chemistry**. 8. ed. New York: Oxford, 2006. p. 515-519.
- BANFORTH, C. W. **Brewing and brewing research: past, present and future**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.80, p. 1371-1378, 2000.
- BELTRAMINI, M. **Cervejas, brejas e birras: um guia completo para desmistificar a bebida mais popular do mundo**. 1. Ed. São Paulo: Leya, 2012. p. 19-45.
- BRASIL. Constituição (1988). **Emenda Constitucional**. n. 9, de 14 de julho de 1994. Lex: legislação. São Paulo, v.59, p. 1966, out./dez. 1995.
- BRASIL. Decreto-lei n. 8.918, de setembro de 1997. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 8 abr. 1988. Seção 1, p. 259-513.
- BRUKER BioSpin. **Software Amix Viewer & Amix Tools**. Version 3.8. 2008.
- DUARTE I. *et al.* **High-Resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis for the characterization of beer**. J. Agric. Food Chem. n.50, p. 2475-2481, 2002.
- DUARTE I. *et al.* **Application of NMR spectroscopy and LC-NMR/MS to the identification of carbohydrates in beer**. J. Agric. Food Chem. n.51, p. 4847-4852, 2003.
- ESCHER, F. F. N. **Determinação da microestrutura e relação com as propriedades dos terpolímeros de etileno-propileno- α -oleofinas**. 2004. 137 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Química da UFRGS. Porto Alegre. 18 de março de 2004. p. 15-16.
- FARO Jr, A. C. *et al.*; **Análise por Componentes Principais de espectros Nexafs na especiação do molibdênio em catalisadores do hidrotreatamento**. Quim. Nova. v.33, n.6, p. 1342-1347, jul. 2010.
- FREITAS, J. C. C.; **Ressonância Magnética Nuclear: fundamentos e aplicações**. In: Jornada Científica da UFES, 2009, Espírito Santo.
- GONÇALVES, E. S. B.; **Aspectos gerais do xilitol e sua aplicação na saúde humana**. Monografia (Bacharelado em Nutrição). 2012. 37 f. Universidade Federal do Piauí. 2012. p. 12-14.
- GUTIERREZ L. E. **Produção de glicerol por linhagens *Saccharomyces* durante fermentação alcoólica**. Anais Esalq, Piracicaba- SP, v.48, p. 55-69, 1991
- LIDE, D. R. **Handbook of Chemistry and Physics**. 87th ed. USA: Taylor and Francis, Boca Raton. 2006-2007.

KHATIB A. *et al.* **Application of two-dimensional J-resolved nuclear magnetic resonance spectroscopy to differentiation of beer.** *Analytica Chimica Acta.* 559, p. 264–270, 2006.

KEUKELEIRE, D.; **Fundamentals of beer and hop chemistry.** *Química Nova.* v.23, n.1, p. 108-109, 2000.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Lehninger Princípios de Bioquímica.** Tradução de Arnaldo Simões e Wilson Lodi. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2002. p. 419-422. Título original: *Lehninger Principles of Biochemistry.*

LERMUSIEAU, G.. BULENS, M.; COLLIN, S. **Use of GC- Olfactometry to identify the hop aromatic compounds in beer.** *J. Food Chem.* v.49, n.8, p. 3867-3874.

MASSART, D. L. *et al.*; **Handbook and Chemometrics and Qualimetrics: Part A. Data Handling in Science and Tecnology,** Amsterdam, v.20A, p. 519-540, 1997.

MEDEIROS, C. D. **Efeito de variáveis de processo no tempo de fermentação da cerveja e na concentração das dicetonas vicenais totais (TVDK).** 2010. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Centro de Tecnologia, Natal. Setembro de 2010. p. 19

MONTERO, C. M. *et al.*, **Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: A Review.** *Chromatographia.* 59, p. 15-30, 2004.

RAMÍREZ, S. C. *et al.* **Analysis of beer components by capillary electrophoretic methods.** *Trends in Analytical Chemistry.* v. 22. 7 e 8, p. 442-50, 2003.

RODRIGES J. A. *et al.* **Evaluation of beer deterioration by gas chromatography–mass spectrometry/multivariate analysis: A rapid tool for assessing beer composition.** *Journal of Chromatography A.* 1218, p. 990–996, 2011.

SILVA, D. P. **Produção e avaliação sensorial de cerveja obtida a partir de mostos com elevadas concentrações de açúcares.** 2005. 177 f. Tese (Doutorado) - Departamento de Biotecnologia, Faculdade de Engenharia Química em Lorena. Lorena. 2005. p. 7 -11, 15-27.

SILVÉRIO, F. O.; **Caracterização de extrativos de madeira de eucalyptus e depósitos de pitch envolvidos na fabricação de celulose e papel.** 2008. 157 f. Tese (Doutorado) Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas. UFMG. 2008. p. 27-28.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J.; **Spectrometric Identification of Organic Compounds.** 7. ed. USA: John Wiley & Sons. 2005. p. 129-135.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M. A.; MACEDO G. A. **O processo de fabricação de cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis.** *Alim. Nutr. Araraquara,* v.19. 4, p. 491-498, out./dez. 2008

Bibliografia online

- A cerveja e seus segredos: Controle de qualidade. In: MINICURSOS CONSELHO REGIONAL DE QUÍMICA-IV. 2010. São Paulo. Disponível em http://www.crq4.org.br/sms/files/file/a_cerveja_e_seus_segredos_site.pdf Acessado em jan. 2014.
- A História do Gruit. Disponível em: <http://www.gruit.es/pt/gruit-historia/la-historia-de-gruit/> Acessado em dez. 2013.
- A lei da Pureza Alemã. jul. 2011. Disponível em: <http://www.cervasfortal.com.br/2011/07/lei-de-pureza-alema.html> Acessado em dez. 2013.
- ANVISA – Resolução – RDC n°271, de 22 de setembro de 2005. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ca624500474594079ba5df3fbc4c6735/RDC_271_2005.pdf?MOD=AJPERES Acesso em jan. 2014.
- BEER Glossary. Disponível em: <http://bendbrewfest.com/beers.html> Acessado em jan. 2014.
- BOHEMIAN Style Pilsener. 2013. Disponível em: http://www.drinkpropeller.ca/beers/18-Bohemian_Style_Pilsener Acessado em dez. 2013.
- 2008 BJCP Style Guidelines: Category 1- Light Lager. Disponível em: <http://www.bjcp.org/2008styles/style01.php> Acessado em jan. 2014.
- “BRASIL é o 3º maior produtor de cerveja do mundo; veja como se faz a bebida”, UOL, São Paulo, 25 out. 2013. Disponível em: <http://economia.uol.com.br/noticias/redacao/2013/10/25/brasil-e-o-3-maior-produtor-de-cerveja-do-mundo-veja-como-se-faz-a-bebida.htm> Acessado em 27 jan. 2014
- CERVEJAS do mundo: História da cerveja- A antiguidade. Disponível em: http://www.cervejasdomundo.com/Na_antiguidade.htm Acessado em dez. 2013.
- CERVEJAS do mundo: As Ale. Disponívem em: <http://www.cervejasdomundo.com/Ale.htm> Acessado em dez. 2013.
- CERVEJAS do mundo: História da cerveja- A Era Medieval. Disponível em: <http://www.cervejasdomundo.com/EraMedieval.htm>. Acessado em dez. 2013.
- CERVEJAS do mundo: As Lager. Disponível em: <http://www.cervejasdomundo.com/Lager.htm> Acessado em dez. 2013.
- COLUNISTA de AZoM.com. Classifying Beer Types Using Spectroscopic Measurement and Multivariate Analysis. Out. 2013 Dispínível em: <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=10236&lang=pt> Acessado em nov. 2013.

- D' ÁVILA R. F. *et al.* Adjuntos utilizados para produção de cerveja: características e aplicações. Estudos Tecnológicos em Engenharia, vol. 8, N. 2, p. 60-68, jul/dez 2012.
- BJCP. DIRETRIZES de estilo BJCP 2008: Diretrizes de estilo para cerveja do Beer Judge Certification Program (BJCP). Revisão de 2008 das Diretrizes de 2004. Tradução para o português de 2012. Disponível em: <http://www.bjcp.org/intl/2008styles-PT.pdf> Acessado em jul. 2014.
- EISENBAHN Hauch Bier. Disponível em: <http://eisenbahn.com.br/cervejas/rauchbier.php> Acessado em dez. 2013.
- HISTÓRIA da cerveja: Um pouco de História da Cerveja. Disponível em: <http://www.cervejahausbier.com.br/si/site/0002/p/Historia%20da%20Cerveja> Acessado dez. 2013.
- Honark, J. P. Spin Physics *In*: Honark, J. P.; The Basics of NMR. 1997-2011. Capítulo 3. Disponível em <http://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm> Acessado em jan. 2014.
- HUGO, Victor. Processos de produção de cerveja. Jan. 2013. Disponível em: <http://www.engenhariadacerveja.com.br/2013/processo-de-producao-de-cerveja/> Acessado em: jan. 2014.
- INGREDIENTES da Cerveja- 2ª parte: Malte, Adjuntos e Outros Ingredientes. Disponível em: <http://www.cervejasdomundo.com/Ingredientes2.htm> Acessado em: jan. 2014.
- INGREDIENTES da Cerveja. Disponível em: <http://www.cervejasdomundo.com/Ingredientes.htm> Acessado em: jan. 2014.
- KÖLSCH Profile. Disponível em: <http://beer.about.com/od/ale/p/kolsch.htm> Acessado em: jan. 2014.
- O que é Reinheitsgebot. 2013. Disponível em: <http://www.ummundodecerveja.com/o-que-e-reinheitsgebot/> Acessado em dez.2013
- PASSOS, Rafael e ALVES, Alessandra. Gerente de depósito é preso suspeito de adulteração de cervejas em Minas: Grupo comprava produtos mais baratos, trocava os rótulos e vendia as bebidas como se fossem Skol e Brahma. em.com.br Publicado em 20/05/2014. http://www.em.com.br/app/noticia/economia/2014/05/20/internas_economia,530650/gerente-de-deposito-e-presosuspeito-de-adulteracao-de-cervejas-em-minas.shtml Acessado em maio 2014.
- PROCESSO de Fabricação da Cerveja. Disponível em: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/historia-da-cerveja/processo-fabricacao-cerveja.php> Acessado em jan. 2014.

- REINOLD M. R. A Flash Pasteurização da Cerveja. Disponível em: <http://www.cervesia.com.br/estabilizacao-da-erveja/151-a-flash-pasteurizacao-da-erveja.html> Acessado em: jan. 2014.
- SILVA, Cléber Moisés. Descritivo Como Fazer Cerveja Lager de Baixa Fermentação. Alquimia da cerveja. Disponível em: http://www.alquimiadacerveja.com.br/Artigos/Descritivo_Como_Fazer_Cerveja_Lager.pdf Acessado jan. 2014.
- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DA CERVEJA. A Cerveja. Disponível em: <http://www.sindicerv.com.br/tipo-erveja.php> Acessado em dez. 2013.
- SOARES, Mábila. Quadrilha é presa em Sete Lagoas suspeita de adulterar de adulterar 600 caixas de cerveja: Grupo comprava cervejas da marca Glacial e levava para um galpão onde era feita a falsificação com rótulos de Brahma e Skol. O tempo. Publicado em 6/9/2013. <http://www.otempo.com.br/cidades/quadrilha-%C3%A9-presa-em-sete-lagoas-suspeita-de-adulterar-600-caixas-de-erveja-1.709427> Acessado em out. 2013.
- TIPOS de Cerveja. fonte: Revista da Cerveja. Disponível em: <http://www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/historia-da-erveja/tipos-de-erveja.php> Acessado em jan_2014.
- VASCONCELOS, S; Análise de Componentes Principais (PCA) Disponível em: <http://www2.ic.uff.br/~aconci/PCA-ACP.pdf> Acessado em: out. 2013

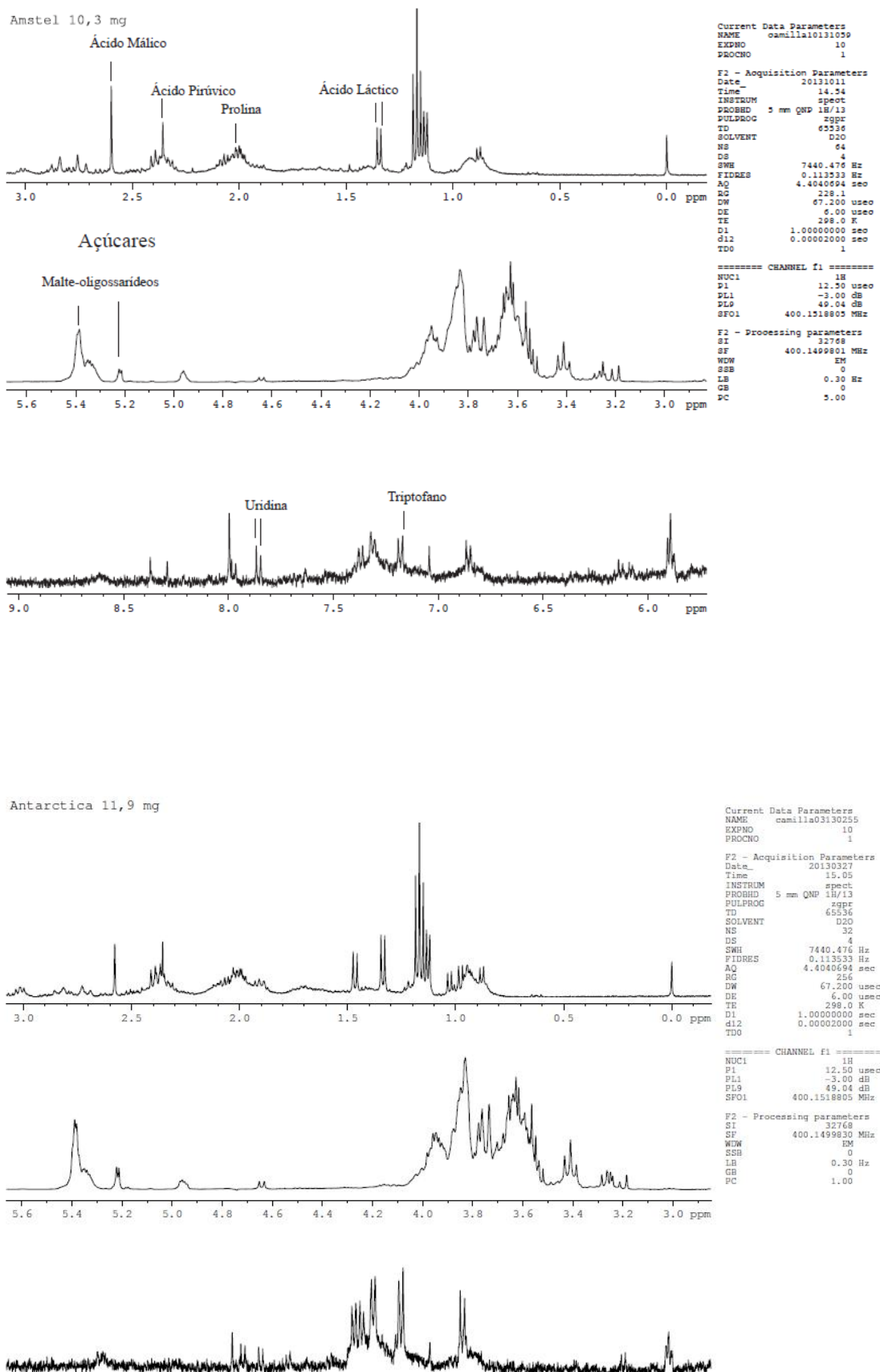
Anexo A - Tabela com deslocamentos químicos

Composto	Atribuição	δ^1 H (ppm)	Multiplicidade
Ácido Acético	β -CH ₃	2,01	s
Ácido Cítrico	α, γ -CH	2,72	d
	α, γ -'CH	2,84	d
Ácido γ - Aminobutírico (GABA)	β -CH ₂	1,92	
	α -CH ₂	2,39	t
	γ -CH ₂	3,02	t
Ácido Láctico	CH ₃	1,34	d
	α -CH	4,19	q
Ácido Málico	β -CH	2,63	dd
	β' -CH	2,82	dd
	α -CH	4,38	
Ácido Pirúvico	β -CH ₃	2,35	s
Ácido Succínico	α, β -CH ₂	2,56	s
Adenosina/ Inosina	C4'H, ribose	4,27	
	C3'H, ribose	4,41	
	C2'H, ribose	4,79	
	C1'H, ribose	6,06	d
	C8H, anel	8,27	s
	C2H, anel	8,35	s
Alanina	β -CH ₃	1,48	d
	α -CH	3,77	
Citidina	C'1H, ribose	5,86	
	C6H, anel	6,09	d
	C5H, anel	7,92	d
Etanol	CH ₃	1,17	t
	CH ₂	3,64	q
	C3H, C5H, anel	7,31	
	C4H, anel	7,37	
	C2H, C6H, anel	7,41	
Histidina	C4H, anel	7,04	s
	C2H, anel	7,99	s
Isobutanol	CH ₃	0,87	d
	CH	1,73	
	CH ₂ OH	3,36	d
Isoleucina	δ -CH ₃	0,92	
	γ' -CH ₃	1,00	
	γ' -CH	1,25	t

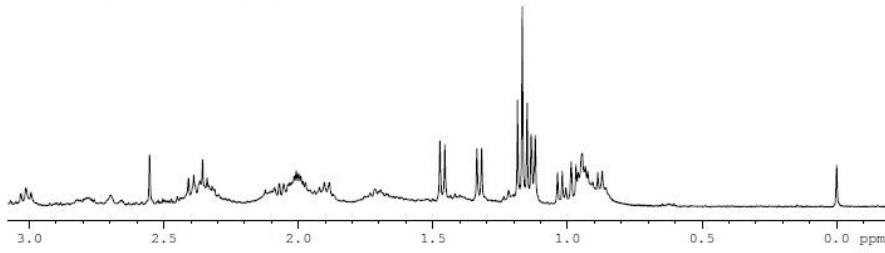
	γ' -CH	1,46	d
	β -CH	1,96	
	α -CH	3,64	
Isopentanol	CH ₃	0,88	
	CH	1,42	d
	CH ₂	1,64	
	CH ₂ OH	3,63	
Leucina	δ , δ' -CH ₃ β	0,94	
	CH ₂ , γ -CH	1,70	
Malto- oligossacarídeos	β -C1H (red.)	4,64	d
	α -C1H (red.)	5,22	d
	C1H α (1- 6)	4,96	
	C1H α (1- 4)	5,3-5,4	
Polifenóis (a)	n.i.	6,84	
	n.i.	7,51	
Prolina	γ -CH ₂	2,00	m
	β' -CH	2,06	m
	β -CH	2,33	m
	δ' -CH	3,32	
	δ -CH	3,41	
	α -CH	4,11	
Propanol	CH ₃	0,88	t
	CH ₂	1,53	m
	CH ₂ OH	3,54	t
	C ₃ H, C ₅ H,	6,81	
Tirosina/ Tirosol	anel	6,89	d
	C ₂ H, C ₆ H,		
	anel	7,11 7,18	d
Triptofano	C ₅ H, anel	7,15	
	C ₆ H, anel	7,24	
	C ₇ H, anel	7,50	
	C ₄ H, anel	7,69	
Uridina	C _{4'} H	4,11	
	C _{3'} H	4,21	
	C _{2'} H	4,38	
	C ₅ H, anel	5,88	d
	C _{1'} H	5,89	
	C ₆ H, anel	7,86	d

d=dubleto, t= tripleto, m=multiplero, q=quintuploto, s=singloto e q=quintuploto

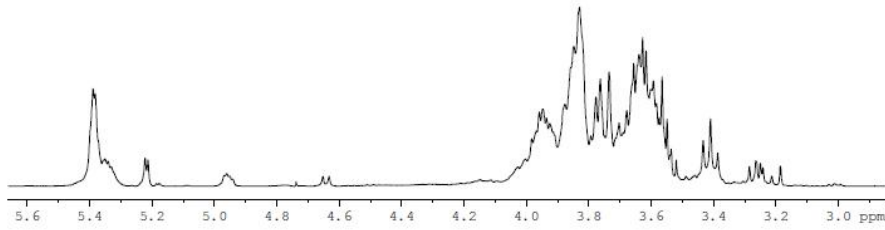
APÊNDICE A - Espectros de RMN



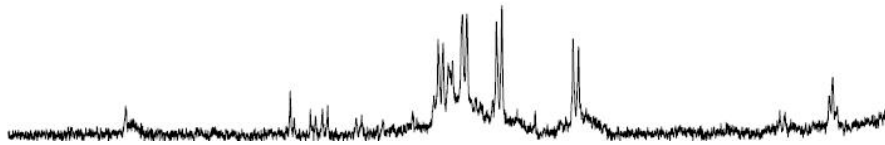
Antarctica sub-zero 10,1mg



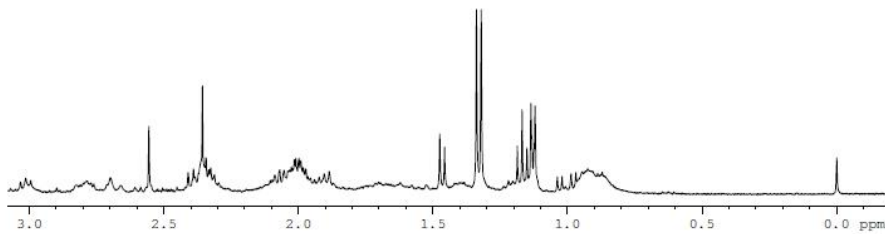
Current Data Parameters
NAME camilla03130273
EXPNO 10
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130328
Time 16.21
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.00000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1



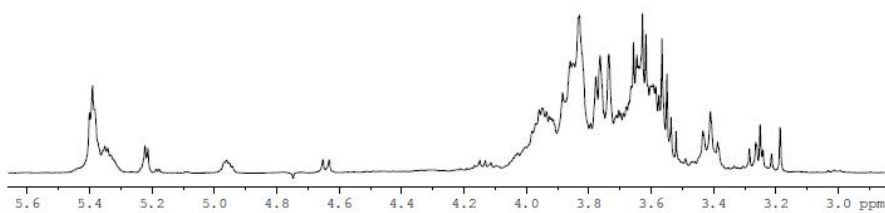
==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499844 MHz
WDM EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00



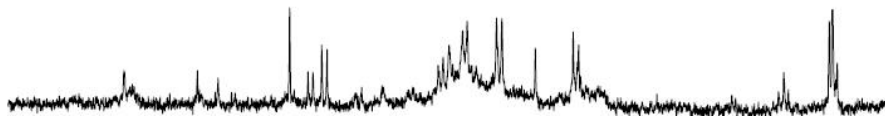
Becks 11,98 mg



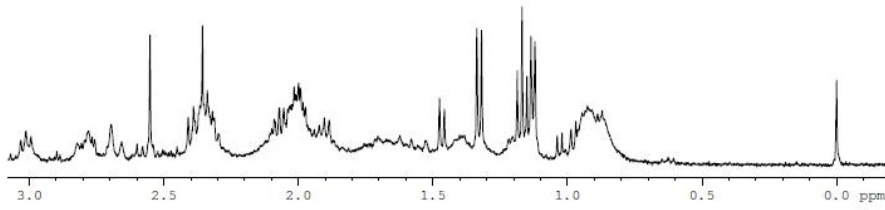
Current Data Parameters
NAME camilla04130322
EXPNO 10
PROCNO 1
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130409
Time 14.45
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 297.9 K
D1 1.00000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1



==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499801 MHz
WDM EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00

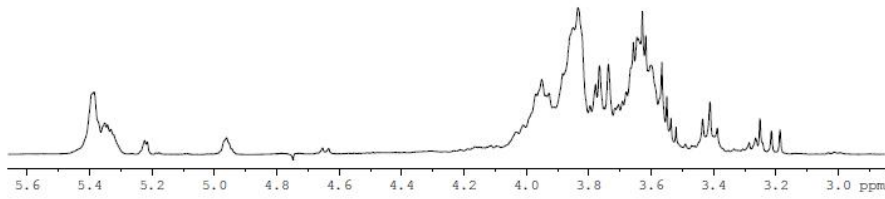


Bitburzer 10,77 mg



```
Current Data Parameters
NAME camilla04130324
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130409
Time 15.23
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

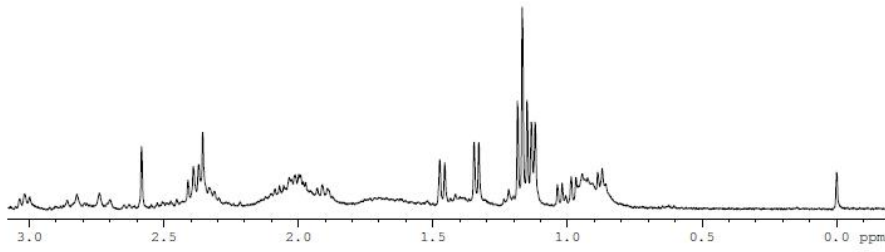


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499799 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```

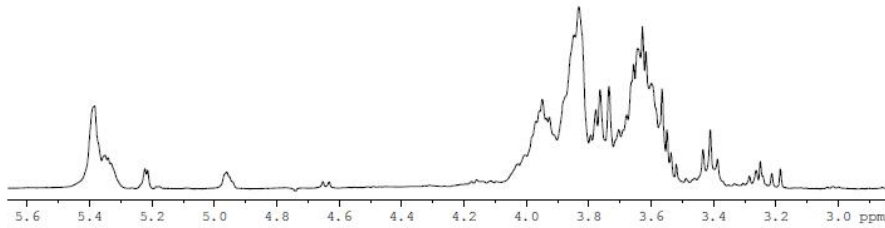


Bohemia 9,9 mg



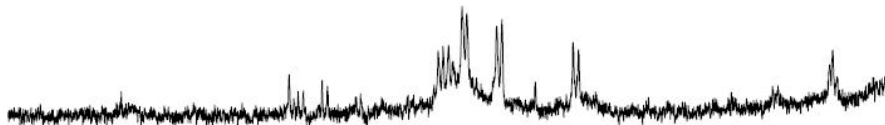
```
Current Data Parameters
NAME camilla03130252
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130327
Time 14.24
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

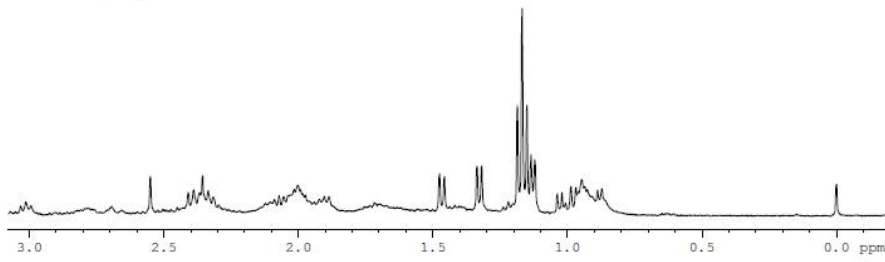


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499833 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```

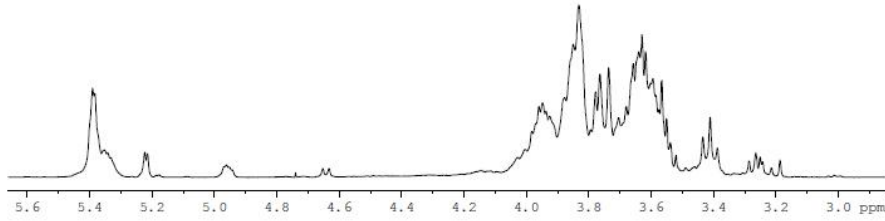


Brahma 10,2mg



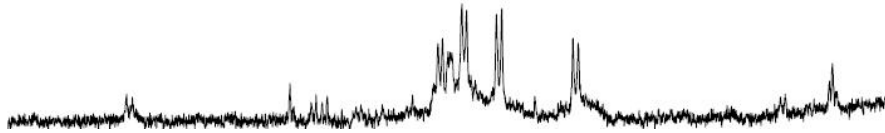
```
Current Data Parameters
NAME camilla03130274
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130328
Time 17.01
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

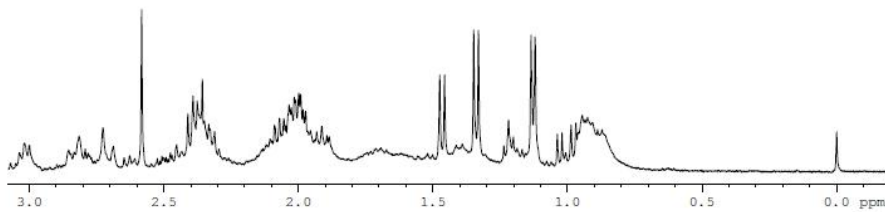


```
==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499898 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```

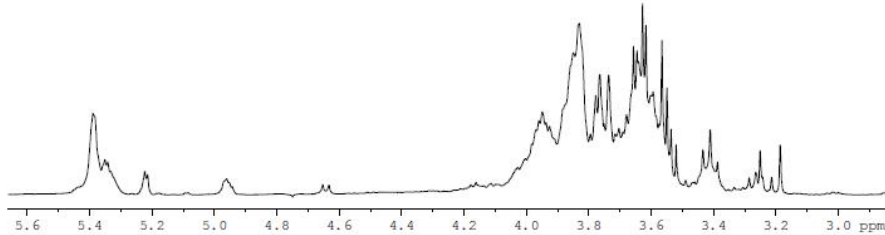


Budweiser 20 mg



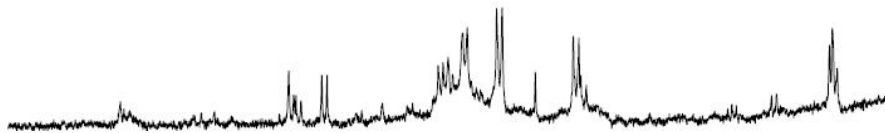
```
Current Data Parameters
NAME camilla04130325
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130409
Time 15.37
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

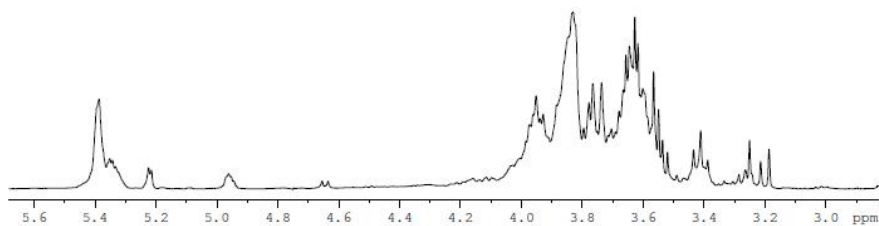
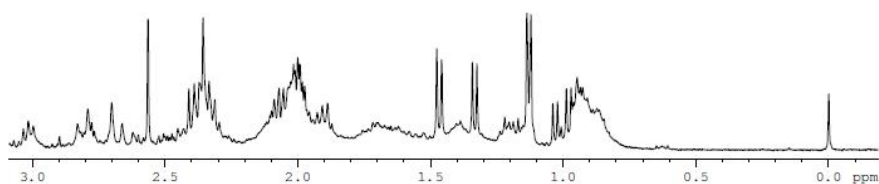


```
==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499788 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```



Carlsberg 12,7 mg

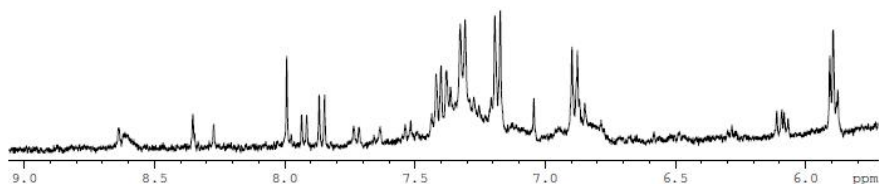


Current Data Parameters
NAME camilla10131050
EXPNO 10
PROCNO 1

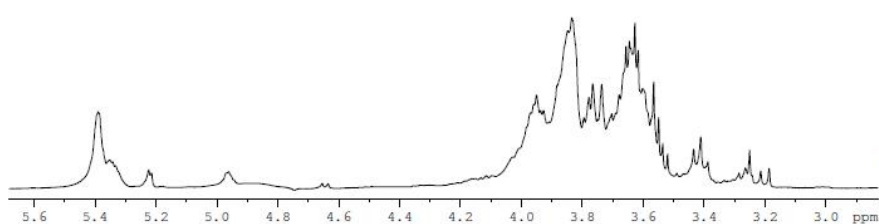
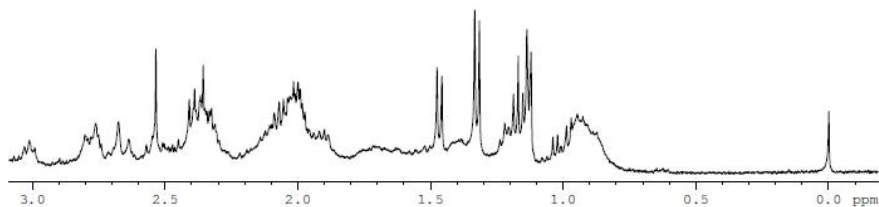
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131011
Time 9.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 128
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
RW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499805 MHz
WDW EM
SSS 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00



Colorado 12,5 mg



Current Data Parameters
NAME camilla10131051
EXPNO 10
PROCNO 1

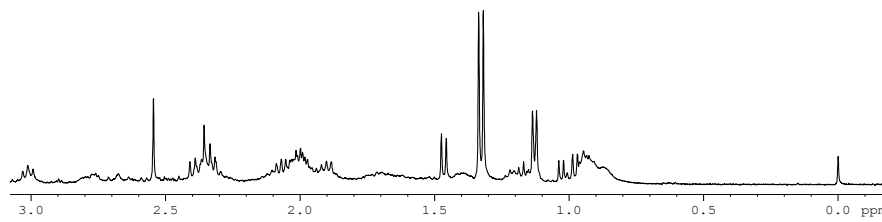
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131011
Time 10.02
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
RW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

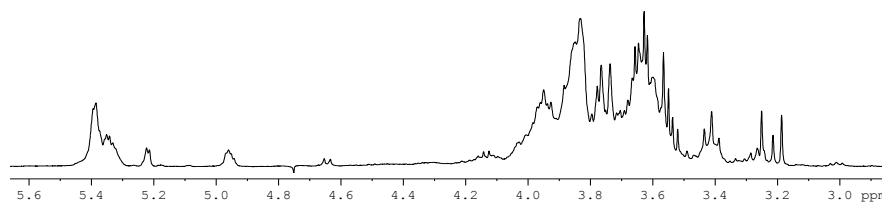
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499812 MHz
WDW EM
SSS 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00



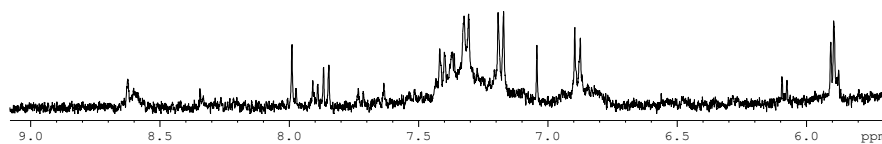
ΔΑΒ 11 μγ
 Οπ. Ελι ανε



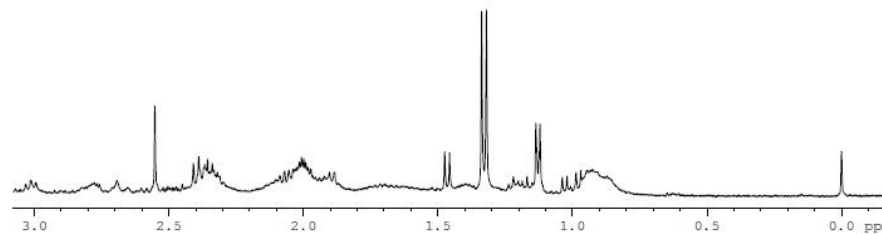
Χύρεντ Δατα Παράμετρος
 NAME χαμλλα05130463
 EXPNO 10
 PROCNO 1
 F2 Αχθυσιατιον Παράμετρος
 Δατε 20130513
 Time 11.48
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 32
 DS 4
 SWH 7440.476 Hz
 FIDRES 0.113533 Hz
 AQ 4.4040694 sec
 RG 228.1
 AQ 67.200 usec
 AE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 AI 1.00000000 sec
 S12 0.00002000 sec
 TD0 1



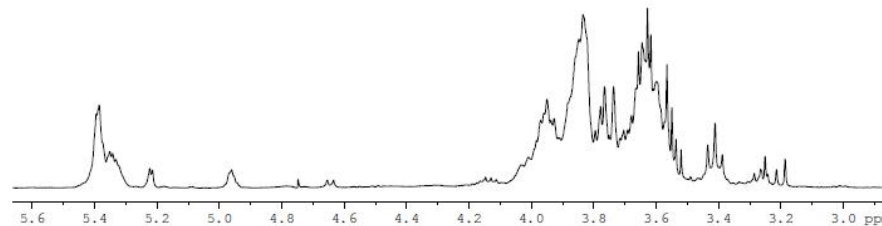
==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 12.50 usec
 PL1 -3.00 dB
 PL9 49.04 dB
 SFO1 400.1518805 MHz
 F2 Προεσσηνυ παράμετρος
 SI 32768
 SF 400.1499784 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 5.00



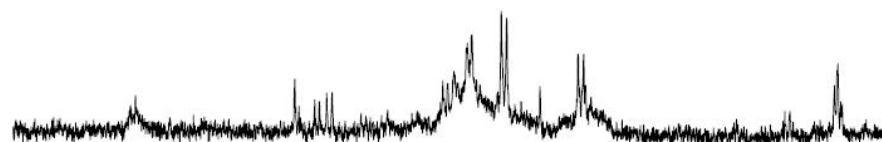
Devassa 15,2 mg



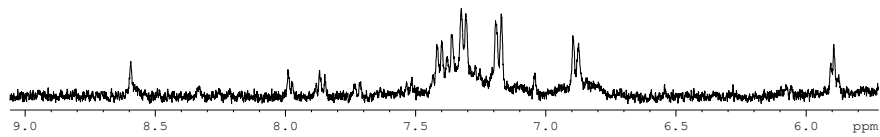
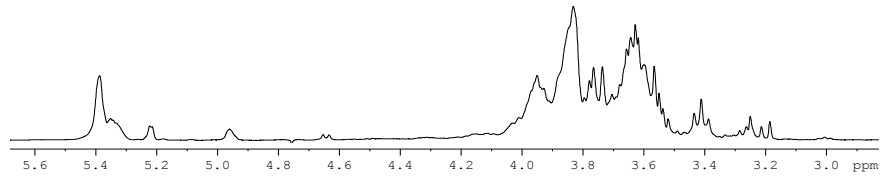
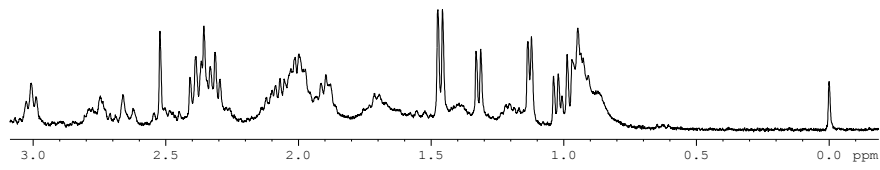
Current Data Parameters
 NAME camilla04130321
 EXPNO 10
 PROCNO 1
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20130409
 Time 14.29
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm QNP 1H/13
 PULPROG zgpr
 TD 65536
 SOLVENT D2O
 NS 32
 DS 4
 SWH 7440.476 Hz
 FIDRES 0.113533 Hz
 AQ 4.4040694 sec
 RG 322.5
 DW 67.200 usec
 DE 6.00 usec
 TE 298.0 K
 D1 1.00000000 sec
 d12 0.00002000 sec
 TD0 1



==== CHANNEL f1 =====
 NUC1 1H
 P1 12.50 usec
 PL1 -3.00 dB
 PL9 49.04 dB
 SFO1 400.1518805 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 400.1499806 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 5.00



Δοφή Βεερ 12,4 μγ



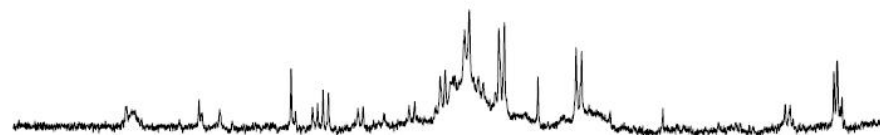
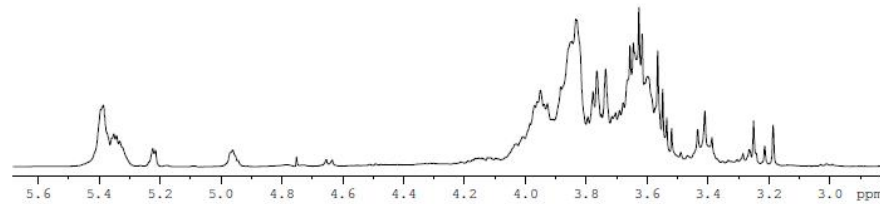
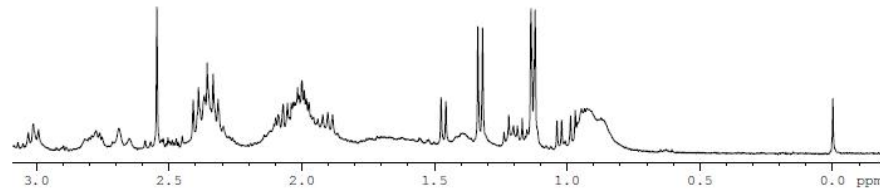
Current Data Parameters
NAME χαμιλλας130470
EXPNO 10
PROCNO 1

Acquisition Parameters
Date_ 20130514
Time 7.52
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
AQ 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499764 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00

Kolsch 11,7 mg



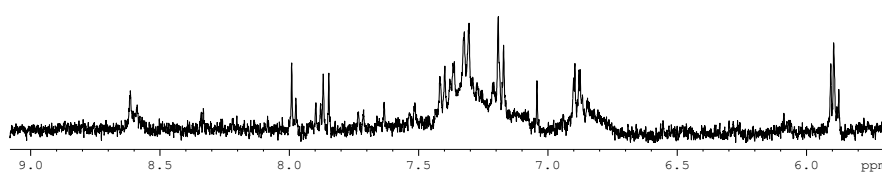
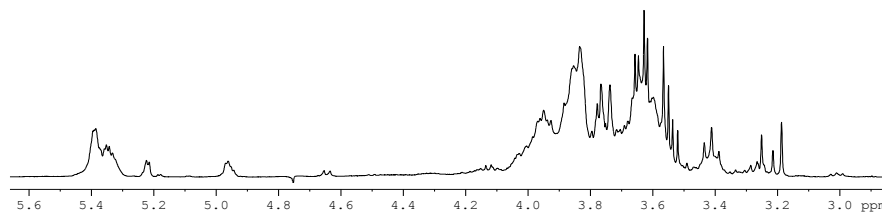
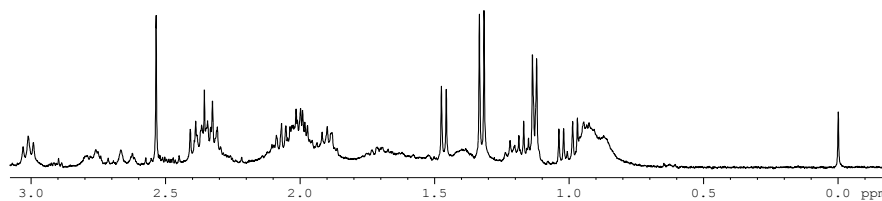
Current Data Parameters
NAME camilla07130760
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130718
Time 11.32
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1

==== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499764 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00

Φθρεν 11,7 μγ
Οπ. Ελιανε



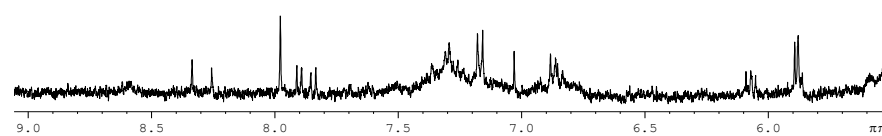
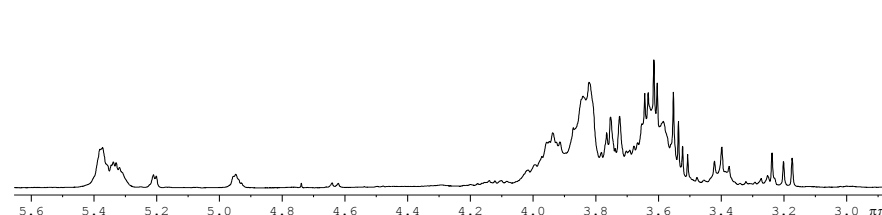
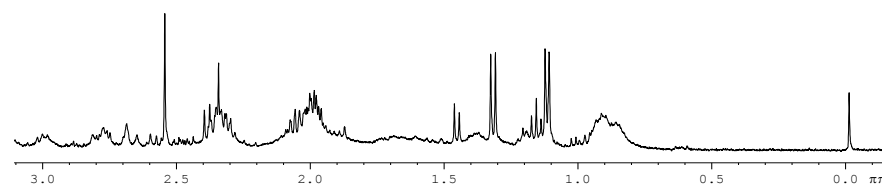
Χωρεντ Δατα Παραμετερα
NAME χαμλλα05130464
EXPNO 10
PROCNO 1

Αχθυστιον Παραμετερα
Δατε 20130513
Τι με 11.59
INSTRUM σεχρτ
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG 5γπρ
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 σεχ
RG 228.1
AQ 67.200 υσεχ
AE 6.00 υσεχ
TE 298.0 K
AI 1.00000000 σεχ
S12 0.00002000 σεχ
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
PI 12.50 υσεχ
P1A1 3.00 dB
PL1 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

Προεσσιγ παραμετερα
SI 32768
SF 400.1499783 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00

Gaffel 10.5 mg



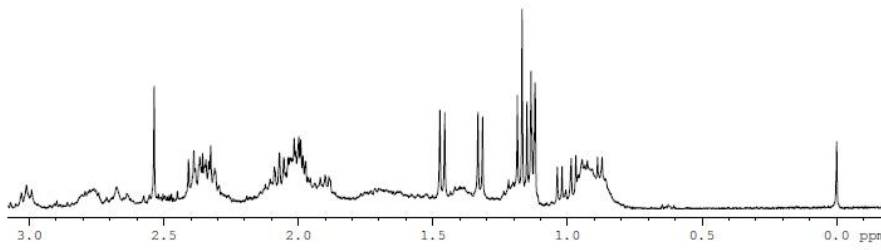
Χωρεντ Δατα Παραμετερα
NAME χαμλλα05130466
EXPNO 10
PROCNO 1

Αχθυστιον Παραμετερα
Δατε 20130514
Τι με 8.15
INSTRUM σεχρτ
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG 5γπρ
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 σεχ
RG 228.1
AQ 67.200 υσεχ
AE 6.00 υσεχ
TE 298.0 K
AI 1.00000000 σεχ
S12 0.00002000 σεχ
TDO 1

----- CHANNEL f1 -----
NUC1 1H
PI 12.50 υσεχ
P1A1 3.00 dB
PL1 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

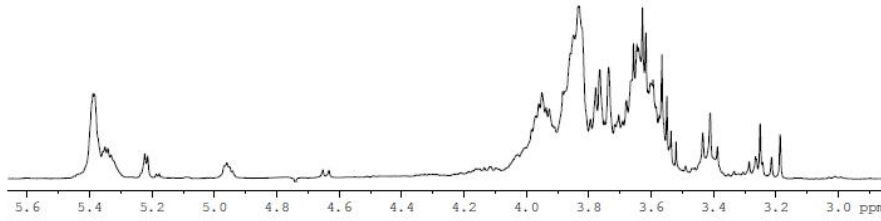
Προεσσιγ παραμετερα
SI 32768
SF 400.1499835 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00

Heineken 10,3 mg



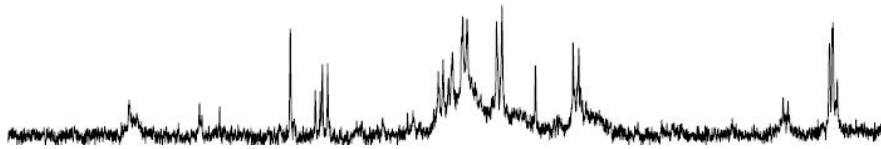
```
Current Data Parameters
NAME camilla03130253
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130327
Time 14.40
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 256
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

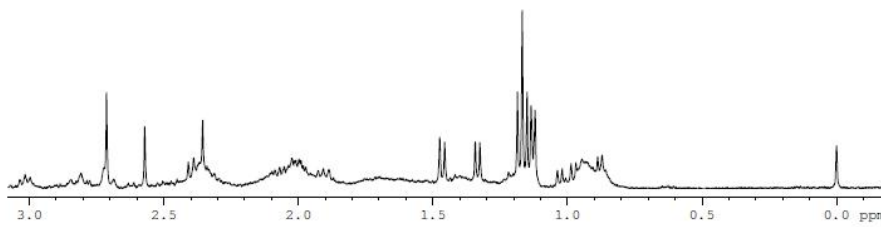


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499834 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 10.00
```

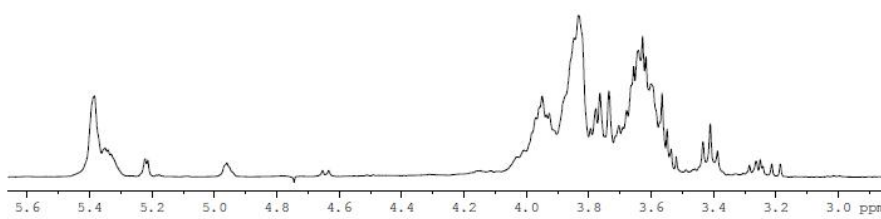


Kaiser 10,1 mg



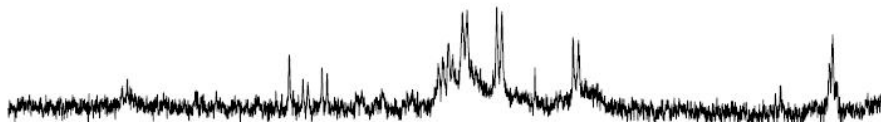
```
Current Data Parameters
NAME camilla03130254
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130327
Time 14.53
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 256
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

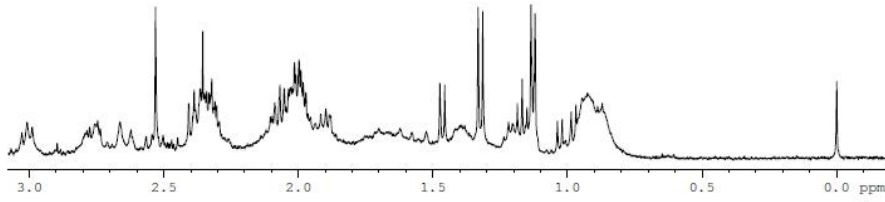


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499819 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```



Konig 10,85 mg

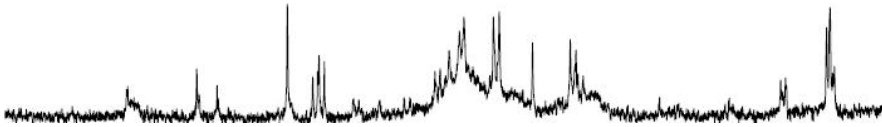
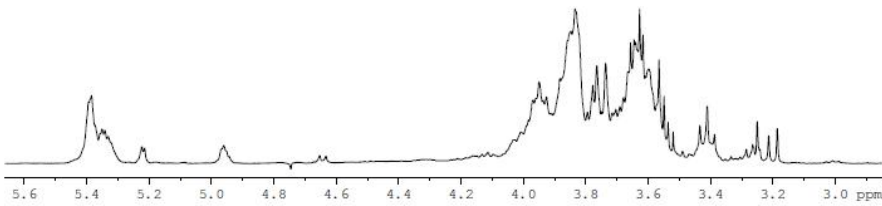


```
Current Data Parameters
NAME camilla04130323
EXPNO 10
PROCNO 1

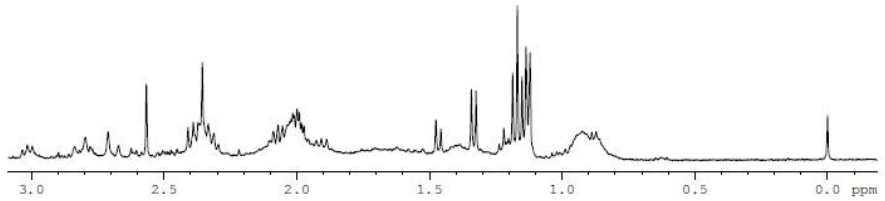
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130409
Time 15.06
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.00000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1
```

```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499810 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```



Mahou 11,9 mg

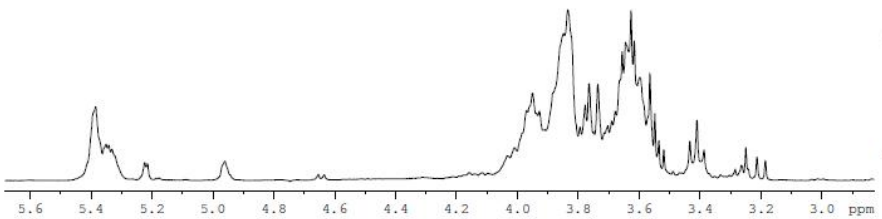


```
Current Data Parameters
NAME camilla10131060
EXPNO 10
PROCNO 1

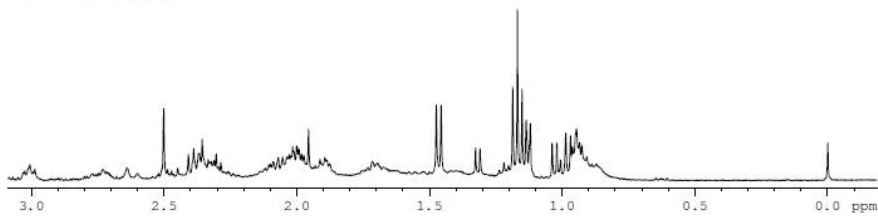
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131011
Time 15.14
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.00000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1
```

```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499810 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```

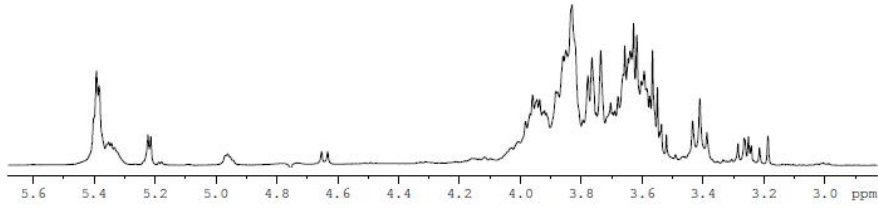


Pale Ale 10,3 mg



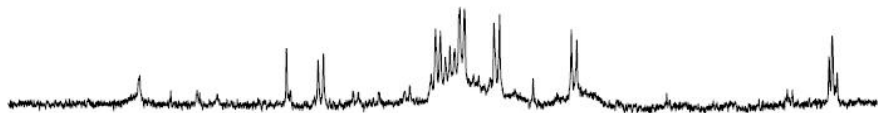
Current Data Parameters
NAME camilla07130761
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130718
Time 11.55
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1

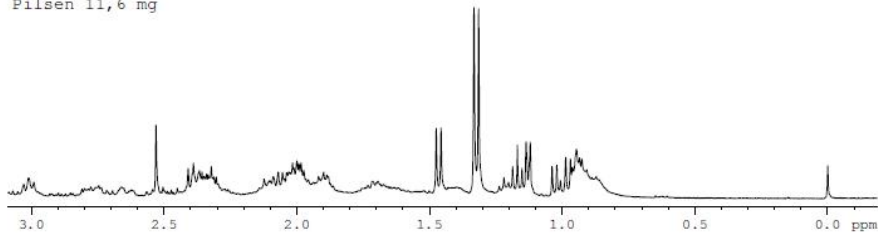


===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SF01 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499790 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00

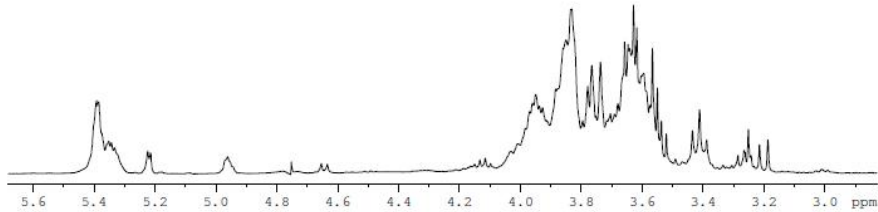


Pilsen 11,6 mg



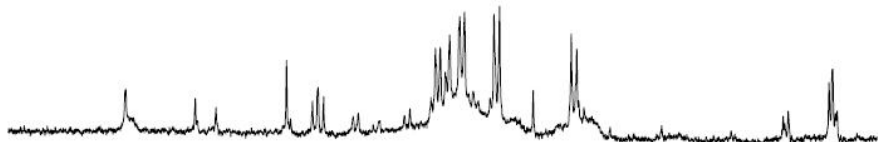
Current Data Parameters
NAME camilla07130763
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130718
Time 12.37
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 128
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.00002000 sec
TDO 1

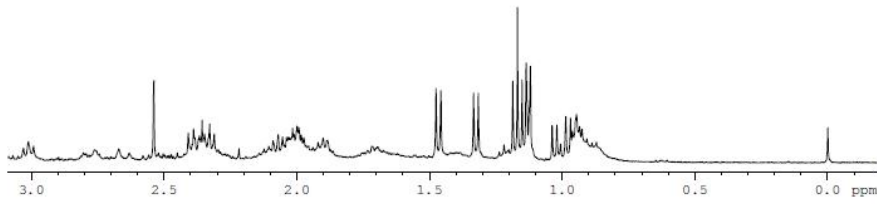


===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SF01 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499790 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00

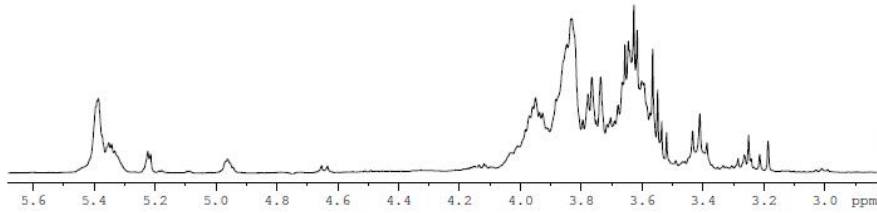


Quilmes 5 11,8 mg



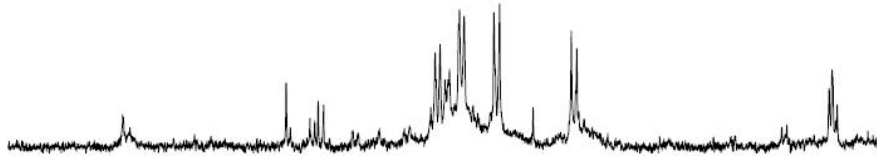
```
Current Data Parameters
NAME camilla0131058
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131011
Time 14.39
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

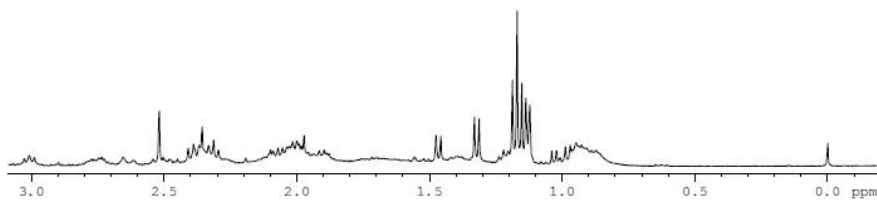


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499801 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```

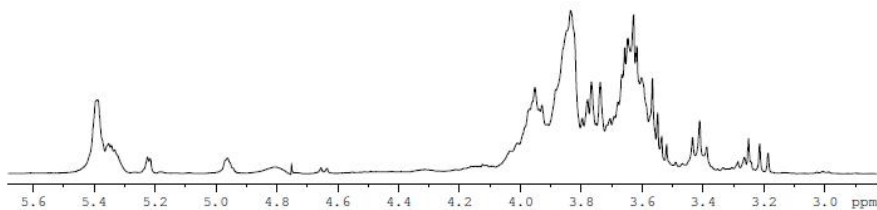


Rauch bier 10,8 mg



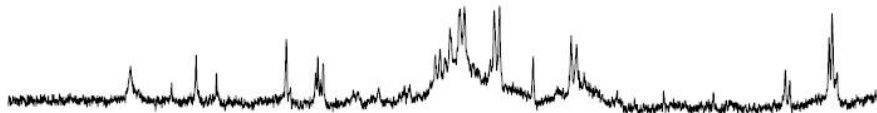
```
Current Data Parameters
NAME camilla07130762
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130718
Time 12.14
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpg
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1
```

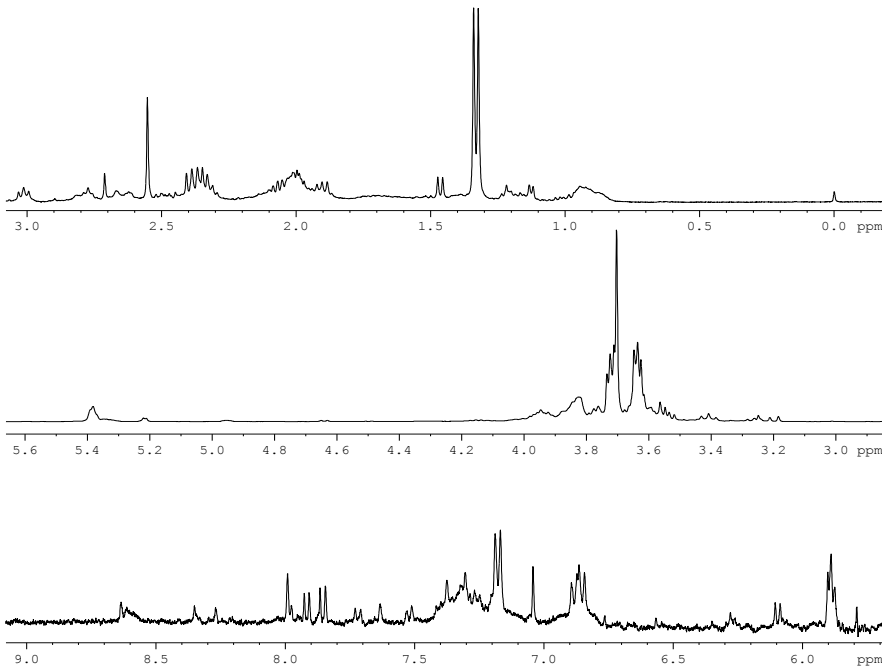


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499801 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```



Σχημα Φιλτραδα 10,7 μg



```

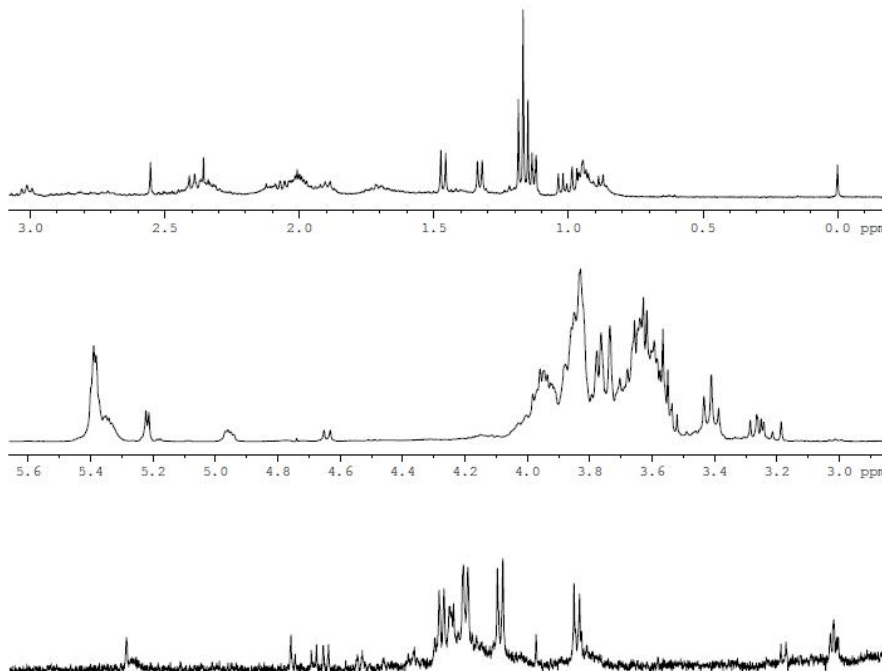
Current Data Parameters
NAME      camilla03130270
EXPNO    10
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20130328
Time     14.55
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H/13
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  D2O
NS       64
DS       4
SWH      7440.476 Hz
FIDRES   0.113533 Hz
AQ       4.4040694 sec
RG       90.5
DE       67.200 usec
TE       298.0 K
D1       1.00000000 sec
d12      0.00002000 sec
TD0      1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       12.50 usec
PL1      -3.00 dB
PL2      49.04 dB
SFO1     400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       400.1499814 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       5.00
    
```

Skol 9,7mg



```

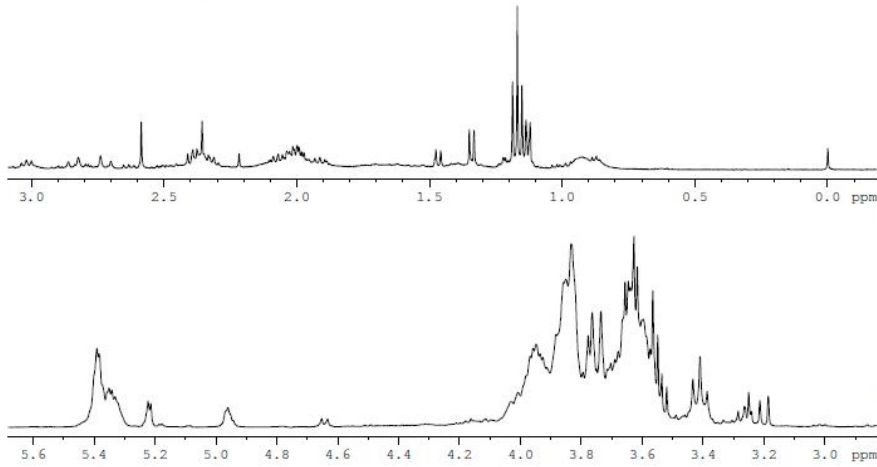
Current Data Parameters
NAME      camilla03130272
EXPNO    10
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20130328
Time     15.50
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm QNP 1H/13
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  D2O
NS       64
DS       4
SWH      7440.476 Hz
FIDRES   0.113533 Hz
AQ       4.4040694 sec
RG       90.5
DE       67.200 usec
TE       298.0 K
D1       1.00000000 sec
d12      0.00002000 sec
TD0      1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1     1H
P1       12.50 usec
PL1      -3.00 dB
PL2      49.04 dB
SFO1     400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       400.1499829 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       5.00
    
```

Skol Inter 2 13,6 mg



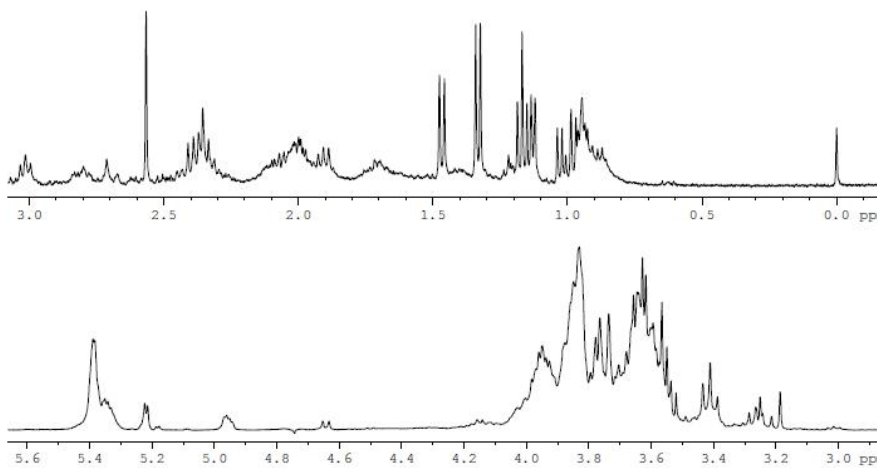
```
Current Data Parameters
NAME camilla0131057
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20131011
Time 14.04
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 64
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 228.1
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.0 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499803 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 5.00
```

Stella Artois 9,6 mg



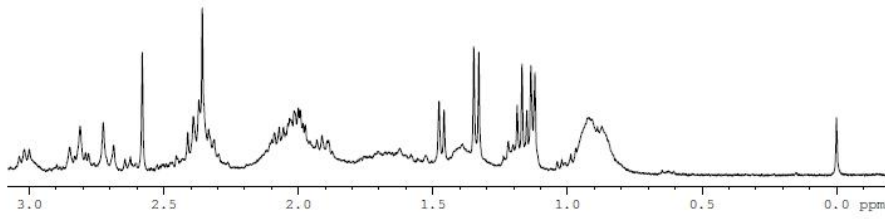
```
Current Data Parameters
NAME camilla03130251
EXPNO 10
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20130327
Time 14.10
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm QNP 1H/13
PULPROG zgpr
TD 65536
SOLVENT D2O
NS 32
DS 4
SWH 7440.476 Hz
FIDRES 0.113533 Hz
AQ 4.4040694 sec
RG 322.5
DW 67.200 usec
DE 6.00 usec
TE 298.2 K
D1 1.0000000 sec
d12 0.0000200 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 12.50 usec
PL1 -3.00 dB
PL9 49.04 dB
SFO1 400.1518805 MHz

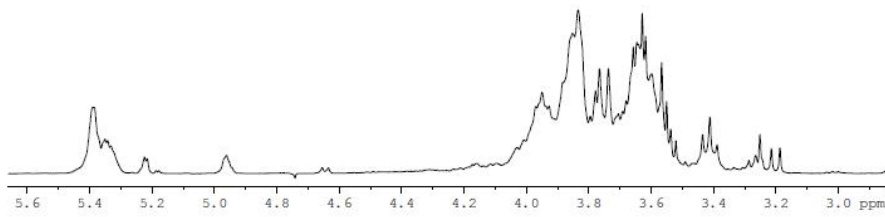
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.1499826 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 6.00
```

Warsteiner 10,23 mg



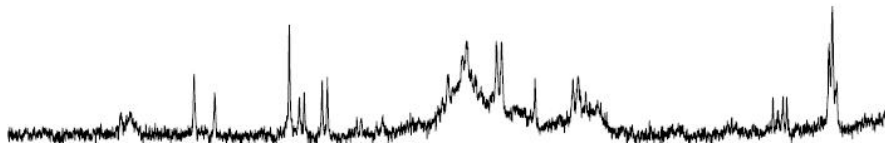
```
Current Data Parameters
NAME      camilla04130275
EXPNO     9
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20130403
Time      14.29
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   D2O
NS         64
DS         0
SWH        8278.146 Hz
FIDRES     0.126314 Hz
AQ         3.9584243 sec
RG         181
PC         60.400 usec
DE         10.00 usec
TE         298.0 K
D1         1.00000000 sec
d12        0.00002000 sec
TDO        1
```

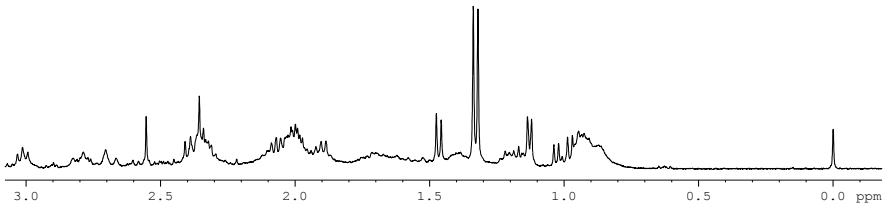


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1         12.50 usec
PL1        -3.00 dB
PL2        49.04 dB
SFO1      400.1518807 MHz

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         400.1499830 MHz
WDW        EM
SSB         0
LB          0.30 Hz
GB          0
PC          5.00
```

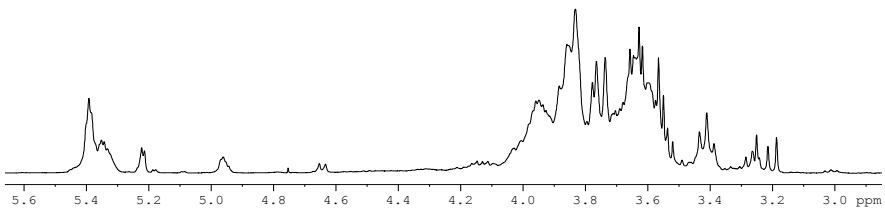


Φάρμα 12,1 μγ
Οπ. Ελι ανε



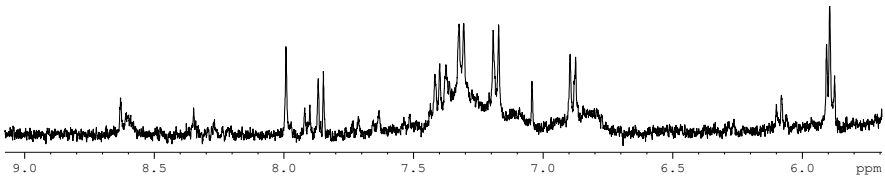
```
Χημικόν Δεδοτ. Παράμετρον
NAME      χαμιλια05130467
EXPNO     10
PROCNO    1

Φ2 □ Αχθυσιατικόν Παράμετρον
Date_     20130514
Time      8.31
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm QNP 1H/13
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   D2O
NS         64
DS         4
SWH        7440.476 Hz
FIDRES     0.113533 Hz
AQ         4.4040694 sec
RG         228
PC         67.200 usec
DE         6.00 usec
TE         298.0 K
D1         1.00000000 sec
d12        0.00002000 sec
TDO        1
```

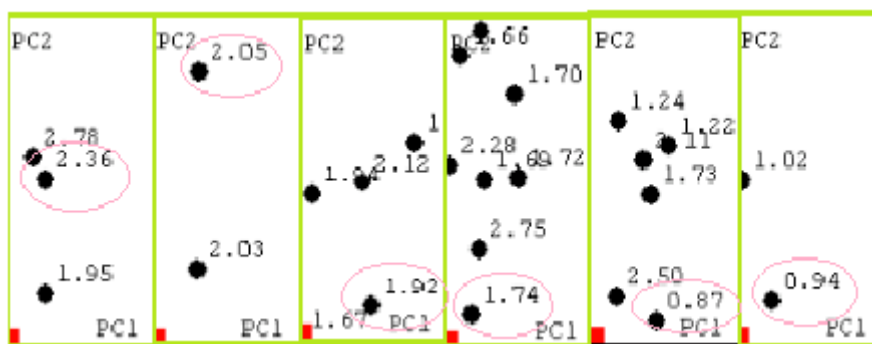


```
===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P1         12.50 usec
PL1        -3.00 dB
PL2        49.04 dB
SFO1      400.1518805 MHz

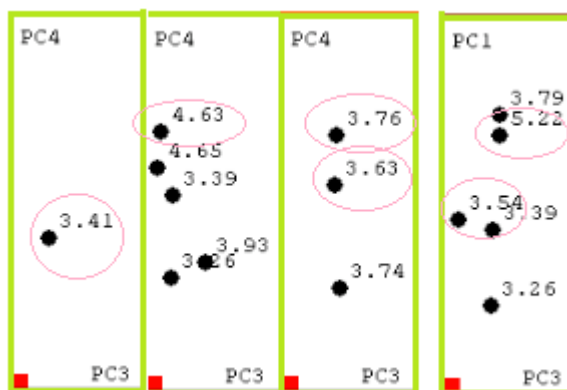
Φ2 □ Προξεσινυ παράμετρον
SI         32768
SF         400.1499774 MHz
WDW        EM
SSB         0
LB          0.30 Hz
GB          0
PC          5.00
```



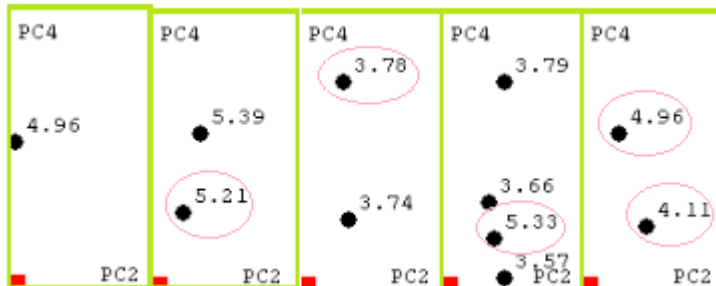
APÊNDICE B - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP1 x CP2 da sub-região E no gráfico de ACP



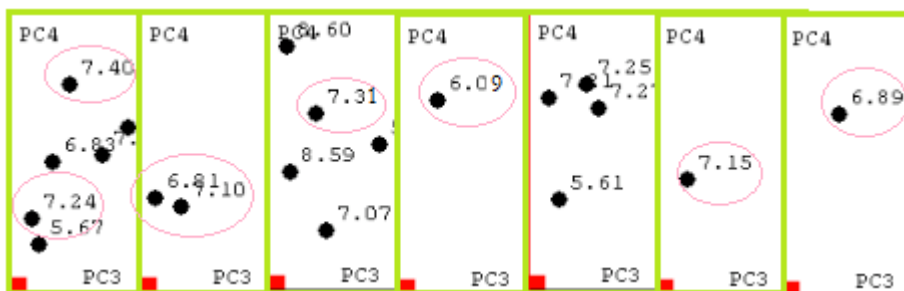
APÊNDICE C - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP1 x CP3 e CP4 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP



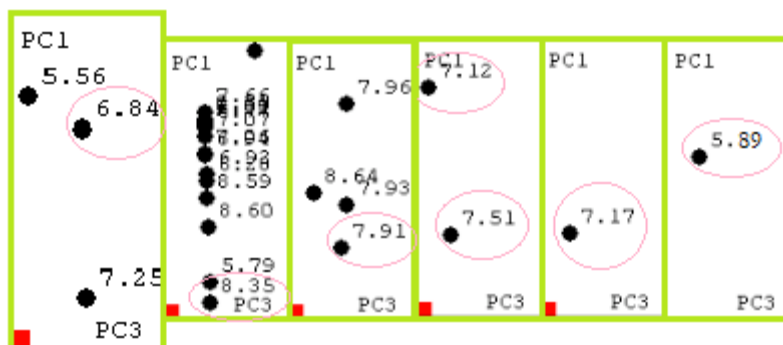
APÊNDICE D - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP4 x CP2 da sub-região E no gráfico de ACP



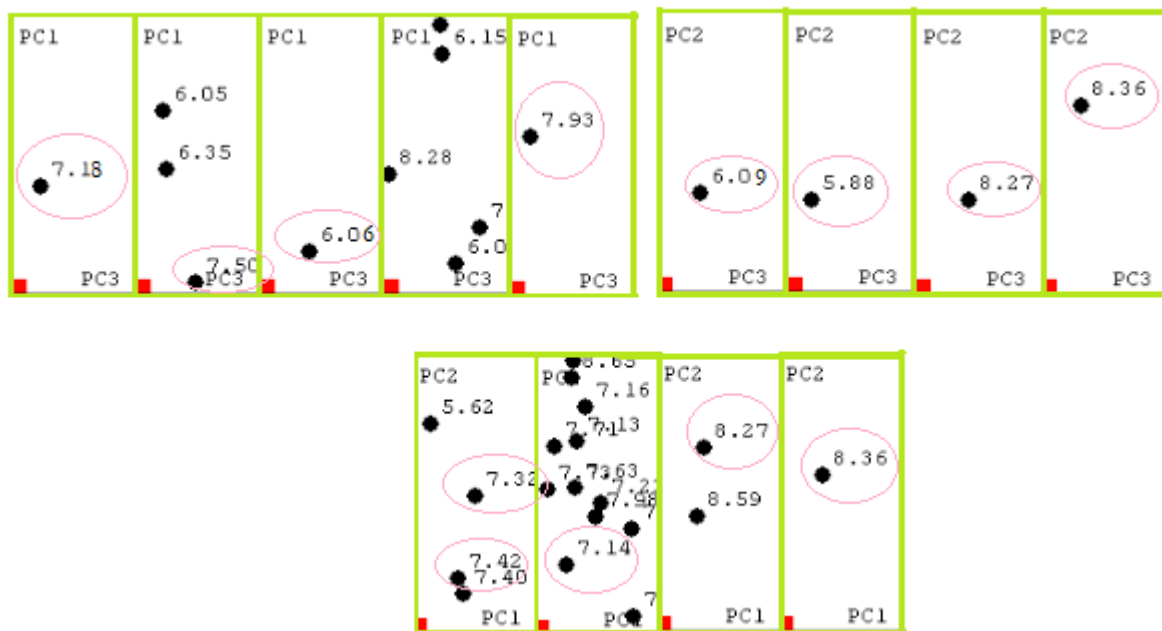
APÊNDICE E – Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP4 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP



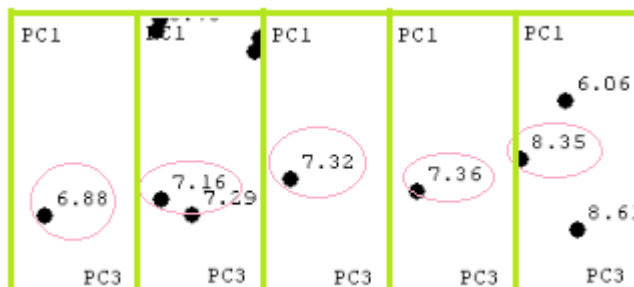
APÊNDICE F - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP1 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP



APÊNDICE G - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP1 x CP3 e CP2 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP



APÊNDICE H - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP1 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP



APÊNDICE I - Deslocamentos químicos nos pontos dos *loadings* no CP2 x CP1 e CP2 x CP3 da sub-região E no gráfico de ACP

