

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**EFEITO DAS VARIÁVEIS DE TRANPORTE E ESTOCAGEM SOBRE
A ESTABILIDADE SENSORIAL DE CERVEJAS TIPO PILSEN**

RUBENS CELSO FONSECA MATTOS

Engenheiro Químico

Mestre em Ciências em Engenharia Química

Mestre Cervejeiro

Prof. Dr. ROBERTO HERMÍNIO MORETTI

Orientador

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Tecnologia de Alimentos**

CAMPINAS – SP

2007

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M436e Mattos, Rubens Celso Fonseca
Efeito das variáveis de transporte e estocagem sobre a estabilidade sensorial de cervejas tipo Pilsen / Rubens Celso Fonseca Mattos . -- Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Roberto Hermínio Moretti
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos

1. Cerveja. 2. Estabilidade sensorial. 3. Transporte. 4. Estocagem. 5. Oxidação. I. Moretti, Roberto Hermínio. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Influence of transport and storage variables on the flavor stability of Pilsen beer

Palavras-chave em inglês (Keywords): Beer, Flavor stability, Transport, Storage, Oxidation

Titulação: Doutor em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Roberto Herminio Moretti

Flávio Luís Schmidt

Helena Teixeira Godoy

João Batista de Almeida e Silva

Kátia Jorge

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

EFEITO DAS VARIÁVEIS DE TRANSPORTE E ESTOCAGEM SOBRE A ESTABILIDADE SENSORIAL DE CERVEJAS TIPO PILSEN

**Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de
Doutor em Tecnologia de Alimentos**

RUBENS CELSO FONSECA MATTOS

Banca examinadora

Prof.Dr. Roberto Hermínio Moretti
DTA - FEA / UNICAMP (Orientador)

Prof.Dr. Flávio Luis Schmidt
DTA - FEA / UNICAMP

Profa.Dra. Helena Teixeira Godoy
DCA - FEA / UNICAMP

Prof.Dr. João Batista de Almeida e Silva
USP - Lorena

Dra. Kátia Jorge
Cervejaria Devassa - RJ

**Ao meu pai, Geraldo, perpetuado em seus
exemplos e ensinamentos.**

**"Morrer é apenas não ser visto.
Morrer é a curva da estrada."
(Fernando Pessoa)**

Agradecimentos

À Roberta, pelo incentivo, suporte, paciência e exemplo.

A Pedro e Vítor, pelas inúmeras vezes que acataram que “papai tem que trabalhar.....”

A minha mãe Wilma, por me ter sempre nutrido valores inquestionáveis e indispensáveis.

Ao Sr. Roberto e D. Lurdes, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Ao meu Orientador, Prof. Moretti, pelo suporte e pela cobrança.

Aos amigos sempre prestativos do Laboratório de Frutas do DTA.

Aos provadores, por sua contribuição essencial nos resultados de análise sensorial.

À equipe do Laboratório Central da Schincariol, pelo suporte analítico e opiniões técnicas sobre o trabalho.

À equipe do Laboratório de Análise de Alimentos, pelo suporte analítico.

Aos professores da FEA, pela disposição em dividir suas experiências.

À toda comunidade FEA, pelo trabalho dedicado a construir um centro técnico de referência, do qual faço parte através da realização deste trabalho de tese.

Ao CNPQ, pela bolsa de estudos.

Índice

RESUMO GERAL	1
SUMMARY	2
1 INTRODUÇÃO GERAL	4
1.1 O mercado de cervejas no Brasil e no mundo	4
1.2 Vida de prateleira de cervejas	6
1.3 Estabilidade sensorial de cervejas	7
1.3.1 Coloração	8
1.3.2 Espuma	8
1.3.3 Brilho	10
1.3.4 Sabor	11
1.4 Experiência prática do autor no gerenciamento de devoluções de cerveja do mercado	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 A química das alterações de sabor da cerveja	14
2.2 Atributos sensoriais da oxidação	18
2.3 Variáveis influentes sobre a oxidação da cerveja na garrafa	20
2.3.1 Uso de antioxidantes	20
2.3.2 Teor de oxigênio dissolvido	22
2.3.3 Metais e polifenóis	23
2.3.4 Temperatura	24
2.3.5 Luminosidade e agitação	26
2.4 Experiência prática do autor na cadeia de distribuição de cerveja no Brasil e no exterior	27
2.5 Prática corrente da análise sensorial nas cervejarias	29

3	MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1	Cerveja utilizada	31
3.2	Definição dos atributos sensoriais para estudo	32
3.3	Formação da Equipe de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)	33
3.3.1	Pré-seleção da equipe	33
3.3.2	Treinamento e seleção da equipe	34
3.3.3	Análise estatística dos resultados	36
3.4	Construção do modelo de aceitação	37
3.4.1	Preparação das amostras	42
3.4.2	Análise estatística dos resultados	44
3.5	Envelhecimento forçado	45
3.5.1	Teste de aceitação	47
3.5.2	Análise sensorial descritiva na cervejaria	49
3.5.3	Análises químicas	50
3.5.3.1	Teor de trans-2-nonenal	50
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1	Teste de aceitação para modelagem	52
4.1.1	Análise estatística convencional	52
4.1.2	Modelagem matemática dos resultados de aceitação	54
4.1.2.1	Avaliação da influência dos fatores sobre a estabilidade sensorial da cerveja	58
4.2	Envelhecimento forçado	62
4.2.1	Teste de aceitação	62
4.2.2	Teste descritivo da equipe da cervejaria	64
4.2.3	Inclusão dos resultados descritivos no modelo proposto	69
4.2.4	Análises químicas	71
4.2.4.1	Teores de trans-2-nonenal	71
4.2.4.2	Cor	75

5	CONCLUSÕES	77
5.1	Influência da temperatura, da agitação e da incidência de luz sobre a estabilidade sensorial	77
5.2	Influência da temperatura, da agitação e da incidência de luz sobre os teores de trans-2- nonenal	77
5.3	Principais ações práticas para prevenir a degradação sensorial da cerveja tipo Pilsen	78
5.4	Influência da intensidade dos atributos papelão, metálico e caramelo sobre a aceitação da cerveja pelo consumidor	78
5.5	Análise sensorial descritiva como critério de tomada de decisão objetiva em cervejarias	79
6	BIBLIOGRAFIA	80
7	ANEXOS	88

Resumo geral

A cerveja tipo Pilsen é líder de vendas no mercado mundial. Ocorre mundialmente a tendência de se produzir cervejas Pilsen com menos amargor, menos corpo e mais claras. O grande desafio atual da indústria cervejeira é a garantia do frescor e leveza desse produto durante todo o seu tempo de vida de prateleira. Com a globalização, as cervejas são transportadas para distâncias cada vez maiores, causando a demanda por um produto que contenha vida de prateleira estendida, ou seja, grande estabilidade sensorial. Níveis mínimos de aromas e sabores indesejados são facilmente percebidos pelo consumidor, pois os teores de amargor, corpo e álcool são insuficientes para mascará-los.

Neste trabalho foi avaliada a influência de importantes variáveis sobre a estabilidade sensorial da cerveja Pilsen. Os efeitos da temperatura, da incidência de luz e da agitação durante o transporte da cerveja, bem como da interação entre eles, foram quantificados e, pela primeira vez, comparados estatisticamente. A literatura cita a influência destas variáveis, mas sua quantificação, interação e comparação, não estão relatados. Os resultados mostraram que a influência da temperatura sobre a estabilidade da cerveja é muito maior que os efeitos de agitação e de incidência de luz. Esses dois últimos, por sinal, têm pouco ou nenhum efeito sobre a estabilidade sensorial do produto. Esses resultados foram validados estatisticamente, tanto por provadores treinados de uma cervejaria comercial, quanto por consumidores comuns. Em oposição ao resultado sensorial, a formação de trans-2-nonenal se mostrou mais influenciada pela incidência de luz e pela agitação, do que pela ação da temperatura, reforçando a corrente de que o teor de trans-2-nonenal não é, por si só, um bom indicador da estabilidade sensorial da cerveja.

Este trabalho traz, ainda, uma ferramenta inédita e muito importante para a tomada de decisões por parte dos cervejeiros. Decidir se uma cerveja pode ou não ser liberada para consumo é uma das tarefas desses profissionais. O critério de liberação pela análise sensorial do produto leva um grau muito alto de subjetividade. Primeiramente, é apresentada uma visão do grau de aceitação do consumidor em relação à oxidação da cerveja, representada aqui pelos níveis dos atributos papelão, caramelo e metálico. Provadores foram treinados usando a técnica de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), para avaliação sensorial desses três atributos. A combinação da análise estatística dos resultados dos testes de aceitação com os resultados da equipe de ADQ

permitiu a construção de um modelo matemático, que é uma ferramenta adequada para a decisão objetiva quanto a comercializar ou não uma cerveja. Com essa ferramenta se elimina a subjetividade da decisão do provador, por mais técnica e respeitada que esta seja na indústria de cerveja. Dentre os atributos sensoriais utilizados para descrever a oxidação da cerveja, a intensidade do atributo papelão é a que tem maior correlação com a estabilidade sensorial do produto. Os atributos caramelo e metálico não apresentaram correlação nem com a opinião dos provadores treinados da cervejaria nem com a aceitação dos consumidores.

Summary

Pilsner is the type of beer produced the most worldwide. There is a global trend to produce beers that are not exactly like the original Pilsner beer: less bitter, less body and paler. The most challenging problem for the breweries at the moment is to guarantee the freshness of this beer during its shelf life. Global sales and markets result in beers being distributed to longer distances and this demands a longer shelf life with high flavor stability. Consumers easily detect minimum contents of off-flavors because the low bitterness, low alcohol content and low body are not capable of masking them.

In this work the influence of important variables on Pilsner beer flavor stability was studied. The impact of temperature, exposure to light and shaking during transportation, as well as the interaction between them, were quantified and, for the first time, statistically compared. The current available reports mention the influence of these three variables over the beer quality, but it is not clear which is the most important nor how is the interaction between them. According to the results obtained here, the temperature plays a major role when compared to shaking and light exposure. In fact, the former two effects showed to have low or even no effect on the stability of the product. Both a trained panel of a commercial brewery and regular consumers had statistically validated this conclusion. Oppositely, the formation of trans-2-nonenal is more influenced by light exposure and shaking than by temperature. This reveals that the content of trans-2-nonenal is, alone, not enough to express beer flavor stability.

This thesis also brings a unique sensory tool to be used by the brewers to decide whether a supposedly oxidized beer can or cannot be dispatched to market. Currently, this decision is made on a subjective basis by judging the freshness of the beer or even the freshness it might present during its shelf life. Judging how much a beer is oxidized is not a simple task and most of the time this is done by only some brewers (sometimes only one), what increases the risk. The acceptance by consumers is here related to the beer oxidation, represented by the attributes papery, caramel and metallic. Subjects were trained to judge the contents of these attributes in the beer using the Quantitative Descriptive Analysis (QDA) technique. The statistical combination of the results of the beer acceptance and the results of the QDA allowed the construction of a mathematical model for deciding objectively about selling or not a beer. With this tool the subjective decision of the taster is eliminated, even though this it is commonly practiced and respected in the beer industry. Concerning the beer attributes used in this work to describe the beer oxidation, the intensity of the attribute papery is the one that is more strongly correlated with the flavor stability of the product. The attributes caramel and metallic do not correlate neither with the opinion of the trained panel nor with the acceptance by the consumers.

1 Introdução Geral

1.1 O mercado de cervejas no Brasil e no mundo

O mercado de cerveja é de grande importância para o Brasil. Representa um faturamento anual da ordem de 10 bilhões de reais. O país produz anualmente o quinto maior volume mundial de cerveja, com produção de 90 milhões de hectolitros no ano de 2005 (Figura 1-1). O mercado brasileiro de cerveja, assim como a produção de outros bens de consumo, sofre influência direta da situação econômica do país.

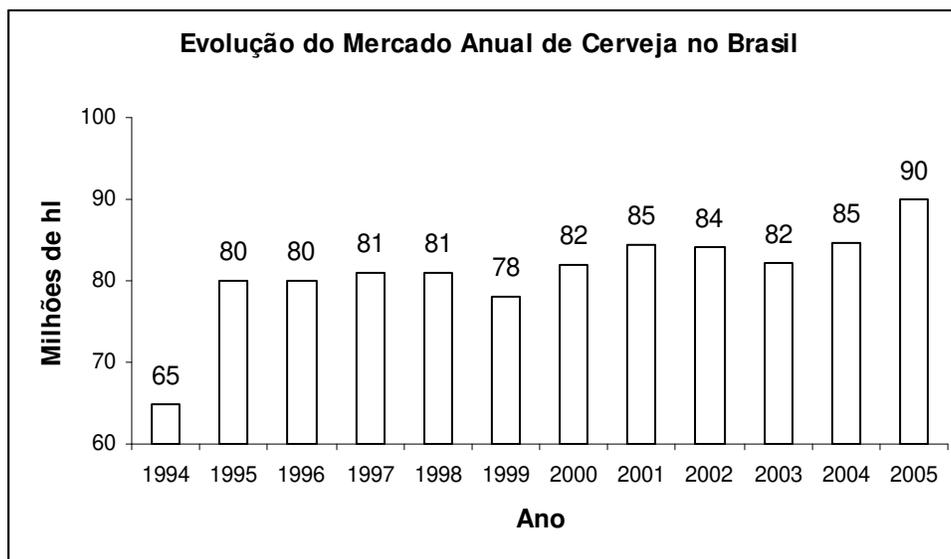


Figura 1-1. Evolução anual do mercado brasileiro de cervejas. Fonte: Sindicerv (2006).

Esse fenômeno também se observa globalmente, sendo que o mercado de cerveja vem crescendo significativamente na China e na Rússia, países que apresentam altas taxas de crescimento também na economia em geral. O fenômeno da globalização tem demonstrado sua força no mercado cervejeiro, sendo muito comuns às fusões e aquisições de cervejarias. A Tabela 1-1 mostra os principais grupos cervejeiros do mundo, com destaque para a InBev, maior produtora mundial de cervejas e formada em 2004 a partir da fusão da cervejaria brasileira AmBev e da belga Interbrew. O estilo administrativo altamente lucrativo da AmBev no Brasil está na verdade dominando a parceria, fazendo com que a InBev seja cada vez mais brasileira.

As fusões e aquisições também afetaram fortemente o mercado nacional de cerveja, principalmente na última década. Marcas que lideraram e competiram no

mercado por muitos anos, hoje pertencem à mesma empresa, o que polarizou o mercado com cerca de 70% de participação para a AmBev, que hoje faz parte da gigante InBev. No início de 2006, a cervejaria Kaiser, que pertencia ao grupo canadense Molson Coors, foi adquirida pelo grupo mexicano FEMSA, prometendo acirrar a briga de gigantes no mercado brasileiro. A Tabela 1-2 mostra a distribuição do mercado nacional para as principais marcas de cerveja.

Por fim, vale destacar o crescimento que se nota no mercado das pequenas e micro cervejarias no país. Estima-se um número mínimo de 60 microcervejarias presentes no mercado brasileiro, a maioria delas com distribuição regional de chope em barril, mas algumas engarrafando suas cervejas e comercializando-as em outros estados consumidores. Como contra-ataque, as grandes cervejarias têm lançado cervejas Premium para concorrer com as microcervejarias em um mercado de maior lucratividade. Um exemplo recente desse movimento foi a compra da Microcervejaria Baden Baden pelo Grupo Schincariol em 2007.

Tabela 1-1. Principais grupos cervejeiros mundiais. Fonte: Barth Report 2006.

Posição	Grupo Cervejeiro	Origem	Volume em 2005 (milhões hl)	Participação Global
1	InBev	Bélgica	202,1	12,6%
2	SABMiller	Inglaterra	176,0	11,0%
3	Anheuser-Busch	EUA	173,5	10,9%
4	Heineken	Holanda	118,6	7,4%
5	Carlsberg	Dinamarca	48,3	3,0%
6	Molson-Coors	EUA/Canadá	48,3	3,0%
7	Modelo	México	45,5	2,9%
8	BBH (Báltica)	Rússia	41,5	2,6%
9	Tsingtao	China	40,9	2,6%
10	Yan Ying	China	31,2	2,0%
11	Scottish & Newcastle	Inglaterra	29,1	1,8%
12	FEMSA (Cuauhtemoc)	México	27,0	1,7%
13	Asahi	Japão	24,6	1,5%
14	Kirin	Japão	22,6	1,4%
15	EFES	Turquia	18,0	1,1%
16	San Miguel	Filipinas	17,0	1,1%
17	Polar	Venezuela	16,5	1,0%
18	Gold Star	China	15,8	1,0%
19	Schincariol	Brasil	15,5	1,0%
20	Radeberger	Alemanha	15,0	0,9%

Tabela 1-2 . Evolução anual da participação percentual no volume de vendas das principais empresas e suas marcas de cerveja no mercado brasileiro. Fonte: Sindicerv (2006)

EMPRESAS	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Brahma	47	47	46	44	43							
Antarctica	30	32	26	25	25							
Kaiser	14	15	17	16	16	15	14	13				
AmBev						70	70	69	69	67	66	68
Molson Coors							4	4	15	13	11	9
Schincariol	5	5	5	8	7	8	8	9	10	11	13	13
Petrópolis											4	5
Cintra									2	2	2	1
Outros	4	1	7	8	10	8	4	4	5	7	5	4

MARCAS (Empresa)	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Skol (AmBev)	17	15	20	23	25	31	33	33	32	33	32	33
Brahma (AmBev)	33	31	29	25	23	22	22	22	22	21	20	20
Antartica (AmBev)	30	32	26	20	18	17	15	15	14	12	13	14
Nova Schin (Schincariol)	5	5	5	8	7	8	8	9	10	11	12	12
Kaiser (FEMSA)	14	15	17	16	16	15	14	13	13	9	7	6
Cristal (Petrópolis)											2	2
Bavária (Molson Coors)				5	7	4	4	4	2	3	2	1
Itaipava (Petrópolis)											2	3
Bohemia (AmBev)										2	2	2
Cintra (Cintra)									2	2	2	1
Outros	1	2	4	3	5	4	4	3	5	7	6	6

1.2 Vida de prateleira de cervejas

Um importante aspecto a ser considerado na comercialização de um alimento ou bebida é a definição da data de validade. Trata-se do tempo de Vida de Prateleira (VP), que é o tempo em que o produto ficará exposto no mercado para ser adquirido pelo consumidor final. Tecnicamente, VP é o tempo que o alimento se mantém próprio para consumo e conserva suas características sensoriais e nutricionais, levando-se em conta as condições de transporte e estocagem a que será submetido. O fabricante é quem define quanto tempo seu produto ficará no mercado, devendo responder pela qualidade do produto se este for consumido dentro do prazo de validade estabelecido. A definição da VP passa por critérios técnicos específicos de cada produto e o fabricante deve analisá-los um a um para garantir a sua qualidade. Produtos com VP mais longa podem ser expostos por mais tempo, reduzindo os custos com a distribuição e aumentando as chances de venda do produto. Uma VP mal definida implica em grandes riscos para o

negócio, como mostra a Tabela 1-3. Visando minimizar esses riscos, o fabricante deve definir a VP com base em parâmetros técnicos específicos de cada um de seus produtos.

Tabela 1-3. Aspectos envolvidos na definição do tempo de vida de prateleira (VP) de um produto

	Conseqüência	Riscos para o negócio
Tempo de VP superestimado	Produto à venda com qualidade inferior à desejada	<ul style="list-style-type: none"> • Consumidor passa a rejeitar o produto (queda de vendas) • Consumidor tem problemas de saúde decorrentes do consumo (responsabilidade civil) • Altos índices de devolução de mercado por problemas de qualidade
Tempo de VP subestimado	Tempo curto para venda do produto	<ul style="list-style-type: none"> • Entrega mais freqüente e necessidade de recolha do produto não vendido (aumento dos custos de distribuição) • Falta de produto nas prateleiras (perda de venda) • Distribuição limitada (curtas distâncias ou necessidade de fretes mais caros; ex: aéreo) • Consumidor opta por produtos com maior VP

O tempo de VP de uma cerveja pode ser desmembrado em:

- VP com base na estabilidade microbiológica
- VP com base na estabilidade sensorial (aparência, aroma e sabor)

Cada parâmetro técnico da cerveja deve ter seu tempo de VP definido e o menor desses tempos é o que definirá a VP de comercialização do produto. Para que o produto tenha maior VP, o esforço deve ser concentrado para aumentar o parâmetro de VP limitante. Esse esforço fica simplificado com o aprimoramento dos conhecimentos técnicos sobre o produto e sobre as alterações físicas, químicas ou microbiológicas que levam o produto a atingir o fim de sua VP.

1.3 Estabilidade sensorial de cervejas

A avaliação sensorial de uma cerveja é formada pela avaliação de sua aparência, aroma e sabor. A aparência de todo alimento ou bebida é essencial na decisão de compra ou na aceitação do produto pelo consumidor. Não diferentes, as cervejas possuem atributos de aparência que indicam sua qualidade. Esses atributos visuais são

característicos de cada tipo de cerveja e se resumem em coloração, espuma (estabilidade e cremosidade) e brilho.

1.3.1 Coloração

Cada cerveja tem sua faixa de coloração típica e é nessa faixa que o consumidor espera visualizar sua bebida quando a serve em um copo. A coloração das cervejas é função dos tipos de malte utilizados, da utilização de corante caramelo, e dos parâmetros de fervura do mosto. Os principais compostos responsáveis pela coloração das cervejas são produtos das reações de Maillard e de caramelização que ocorrem durante a secagem/cura do malte e durante a fervura do mosto. Um pequeno aumento de coloração também é observado durante a VP das cervejas mais claras e foi proposta sua utilização como indicador do grau de oxidação do produto, porém esse indicador mostrou baixa correlação com os resultados de análise sensorial do sabor oxidado (Lynch & Seo, 1987). O controle sobre a coloração das cervejas durante o processo é relativamente simples e se baseia na especificação correta da qualidade das matérias-primas em uso, e na padronização das operações de fabricação.

1.3.2 Espuma

Há controvérsias quando se trata da espuma da cerveja. Determinados consumidores não apreciam cerveja com espuma, alegando que pouca ou nenhuma espuma no copo representa uma maior quantidade de líquido a ser ingerida. Faz sentido. Além disso, o hábito de se consumir a cerveja “estupidamente gelada” não permite um desprendimento suficiente de bolhas de gás carbônico do líquido, levando à pouca formação de espuma. Como gosto não se discute (se atende), esses consumidores estão certos e não relatam problemas com a falta de espuma na cerveja. Contudo, no processo de produção, os cervejeiros tem o teor de espuma como um parâmetro de qualidade e procuram atender aos consumidores que apreciam a cerveja com espuma. Além do aspecto visual, são atribuídas à espuma as funções de isolamento térmico (isola o líquido frio do ambiente mais quente) e de barreira contra a volatilização rápida dos aromas da cerveja.

A espuma da cerveja é formada por bolhas de gás carbônico envolvidas por proteínas (Figura 1-2). Essas proteínas são, especificamente, as de peso molecular de

cerca de 13 kDa e acima de 40 kDa. Além do tamanho específico, possuem características hidrofóbicas, conferidas pela presença de aminoácidos hidrofóbicos em sua estrutura primária. O elevado peso molecular aliado à hidrofobicidade faz com que essas proteínas fiquem localizadas próximas às bolhas de gás carbônico desprendidas do líquido, formando uma rede tridimensional que retém as bolhas de gás e dificulta o escoamento do líquido (cerveja). Portanto, maiores quantidades de bolhas de gás carbônico e maiores quantidades dessas proteínas favorecem a formação de espuma. Cervejas com pouco desprendimento de gás carbônico (seja por falta de carbonatação ou pela temperatura muito baixa do líquido) ou com pouca proteína levam à ineficiente formação de espuma. Compostos que aumentam a tensão superficial da cerveja fazem com que o líquido esorra com mais dificuldade por entre as bolhas de gás carbônico e, portanto, contribuem para estabilizar a espuma. O alginato de propilenoglicol é comumente adicionado à cerveja para esse fim.

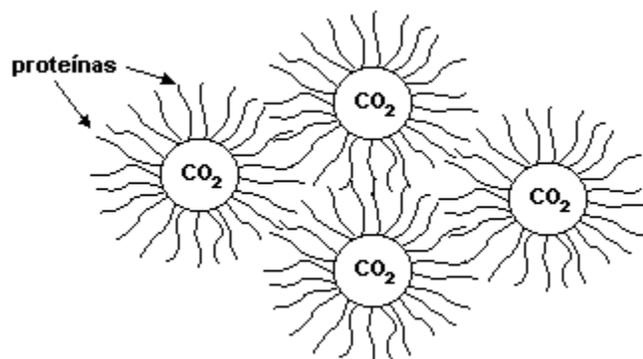


Figura 1-2. Representação da formação da espuma da cerveja: as bolhas de gás carbônico são envolvidas por proteínas de alto peso molecular com características hidrofóbicas (Lewis, 1996).

É importante ressaltar que cada molécula de proteína que forma a espuma perde essa funcionalidade após o rebatimento das bolhas, ou seja, cada molécula só forma espuma uma vez. Portanto, qualquer formação de espuma no processo deve ser evitada para que as proteínas se mantenham funcionais no momento em que a cerveja é servida. Outras moléculas hidrofóbicas eventualmente presentes (ex: lipídeos), concorrem com as proteínas para se localizar próximo às bolhas de gás. Essas moléculas prejudicam a espuma, pois interferem na formação da rede de proteínas. Por esse motivo os copos

devem estar limpos, caso contrário a espuma será prejudicada. A gordura dos alimentos, levada ao copo através dos lábios também causa esse efeito indesejado.

1.3.3 Brilho

Há cervejas tradicionalmente turvas, que não são filtradas ou que sofrem fermentação secundária na garrafa. Cervejas muito escuras também não têm necessidade de serem filtradas, pois sua coloração mascara a turbidez. Para essas cervejas, o parâmetro de turbidez não tem grande importância. Contudo, para as cervejas filtradas de média e baixa coloração, o brilho ou a baixa turbidez é um fator muito importante na aparência do produto. Isso fica mais evidente nas cervejas comercializadas em garrafas sem coloração, onde o brilho é realçado pela incidência da luz sobre o produto.

A turbidez das cervejas é causada pela presença de partículas em suspensão, que desviam a luz incidente. Essas partículas são células de levedura, polissacarídeos insolúveis (amido, pentosanas) e, principalmente, precipitados tanino-protéicos. O processo de filtração da cerveja maturada promove a remoção dessas partículas, que ficam retidas na torta de auxiliar filtrante. Partículas de diatomita ou perlita utilizadas para a filtração podem permanecer na cerveja e também causar turbidez. Não obstante a filtração de boa qualidade corre-se o risco da cerveja turvar no mercado. O desenvolvimento de microrganismos deteriorantes é uma das causas da turvação da cerveja no mercado e se refere à estabilidade microbiológica do produto. A estabilização coloidal da cerveja é a garantia de que a cerveja não se tornará turva no mercado.

A turvação no mercado é provocada pela interação química entre proteínas, taninos e metais (principalmente Cu^{++} e Fe^{++}); carboidratos de alto peso molecular estão eventualmente presentes. Como proteínas e taninos estão presentes na cerveja, existe a possibilidade de ocorrer a interação, formando os flóculos de alto peso molecular causadores da turvação indesejada. A estabilidade coloidal é garantida através de boas práticas cervejeiras em diversos pontos no processo:

- a) escolha das matérias-primas;
- b) procedimentos de moagem, mosturação, clarificação do mosto, fervura, separação de trub (Figura 1-3), maturação e filtração;

c) uso de estabilizante coloidal.



Figura 1-3. Precipitados de proteínas e taninos (trub) formados durante a fervura do mosto

O objetivo no processo, é forçar que os flóculos se formem para que sejam retirados por decantação ou na filtração, evitando que se formem no mercado. O uso de estabilizantes coloidais é prática corrente nos dias atuais para aumento da VP do produto. Originalmente, a cerveja não continha estabilizantes coloidais. Era mais estável pelas seguintes razões: (i) produção de cerveja 100% malte; (ii) tempos prolongados de mosturação, clarificação e fervura do mosto; (iii) longos tempos de maturação, (iv) distribuição de cerveja somente para regiões próximas.

1.3.4 Sabor

Como outros alimentos e bebidas, a cerveja pode sofrer a ação de microrganismos deteriorantes que causam alterações das mais diversas no sabor do

produto. Todavia, este trabalho trata de reações químicas que ocorrem sem o envolvimento de microrganismos. Dentre os aspectos relacionados à estabilidade química do sabor da cerveja, destacam-se as seguintes transformações:

- Oxidação à luz (lightstruck) – provém da exposição dos iso- α -ácidos à luz ultravioleta, e pode ser inibido pela escolha de um sistema de embalagem com barreira adequada (garrafa cor âmbar), ou pela utilização de lúpulo estável à luz (iso- α -ácido reduzido) (Figura 1-4). A oxidação à luz é um problema bastante conhecido e considerado sob controle com o conhecimento técnico atual. Grande cuidado deve ser tomado durante a produção da cerveja que será submetida à ação excessiva da luz UV. Qualquer contaminação do produto com iso- α -ácido não reduzido leva à formação de forte aroma sulfurado, relatado por alguns provadores como “aroma de gambá”.

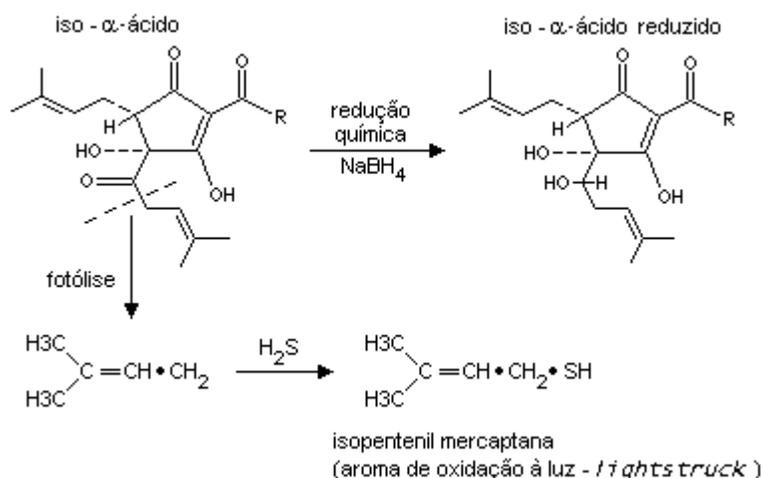


Figura 1-4. Esquema de formação da mercaptana responsável pelo aroma de lightstruck (ação da luz UV sobre os iso- α -ácidos). Essa reação pode ser evitada pela utilização de lúpulos reduzidos quimicamente, permitindo a comercialização da cerveja em garrafas claras. (Hashimoto, 1981)

- Oxidação química – ocorre em todas as cervejas e tem sua velocidade de ocorrência e efeito aumentados com o aumento da temperatura de estocagem, o aumento do teor de oxigênio dissolvido na cerveja, a presença de íons metálicos como ferro e cobre e a vibração durante o transporte. Seus efeitos podem ser reduzidos pela utilização de antioxidantes. A oxidação química se dá por diversas causas químicas e físicas durante a estocagem da cerveja e limitam a vida de prateleira pela diminuição da qualidade sensorial do produto.

1.4 Experiência prática do autor no gerenciamento de devoluções de cerveja do mercado

A cerveja Pilsen, de coloração clara, sabor delicado e baixo teor alcoólico corresponde a 98% de toda a cerveja consumida no Brasil (Sindicerv, 2006). O restante da cerveja se divide entre as do tipo Premium, Bock, Malzbier, Stout e Light, geralmente dedicadas a alguns nichos específicos de mercado. Com essa predominância das cervejas tipo Pilsen, as diversas marcas de cerveja Pilsen do mercado tem sabor muito parecido. O principal instrumento de diferenciação de produtos passa então a ser a imagem subjetiva frente aos consumidores (divulgação na mídia). Isso é válido para cervejas Pilsen que atendam determinadas características mínimas, como a ausência de sabores e aromas indesejados.

Durante três anos este autor foi responsável pelo monitoramento das devoluções de cervejas feitas pelos consumidores para uma grande cervejaria brasileira. Diversos eram os motivos para a devolução, e o trabalho consistia exatamente em estratificar esses motivos e trabalhar para eliminar as causas que levavam ao aparecimento dos problemas. Problemas relacionados à embalagem (volume de enchimento, ilegibilidade /ausência da data de validade, amassamentos, etc...) eram os motivos mais frequentes e seu tratamento envolvia ajuste de máquinas e padronização de embalagens nas linhas de envase. Com relação ao líquido (cerveja) a grande maioria (cerca de 70%) das reclamações se devia a sabor alterado / oxidado.

Esse é um dos grandes objetivos da maioria das cervejarias na atualidade: retardar ou minimizar a alteração do sabor da cerveja no mercado (genericamente tratada como “oxidação da cerveja”). Essa alteração é causada pelo envelhecimento do produto e está relacionada a parâmetros técnico-operacionais que resultam numa maior ou menor propensão do produto às alterações químicas indesejadas. Além da estabilidade sensorial, o “drinkability” das cervejas também é, atualmente, um fator de interesse da indústria cervejeira visando aumento de qualidade e de vendas (Mattos & Moretti, 2005).

2 Revisão bibliográfica

2.1 A química das alterações de sabor da cerveja

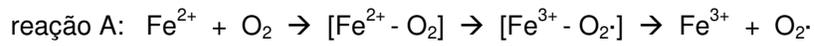
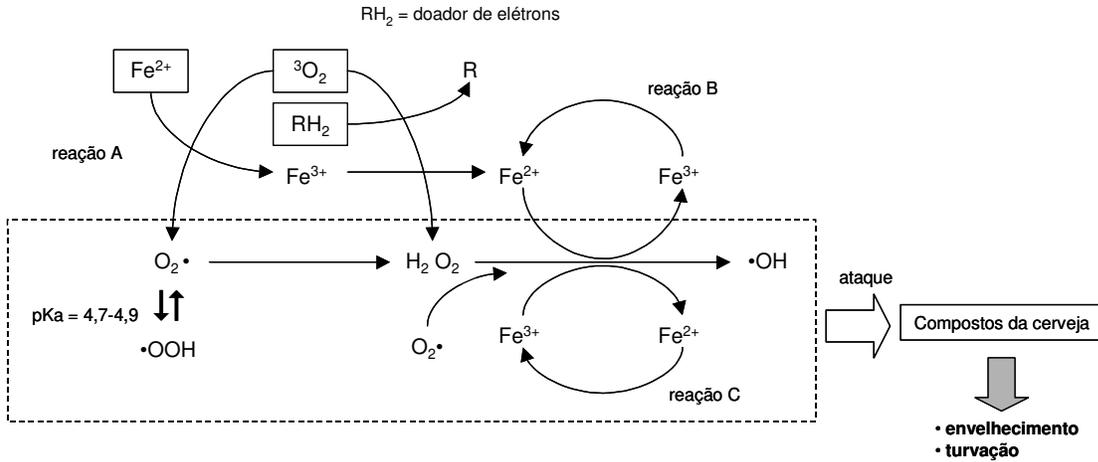
O sabor de oxidação ou de envelhecimento da cerveja é causado pela formação ou liberação de compostos carbonílicos (que contém $\text{C}=\text{O}$ na estrutura) no produto envasado, principalmente os compostos de baixo limiar de detecção contendo 7 a 10 átomos de carbono. Os termos mais usados para descrição sensorial do problema causado por esses compostos, além de "oxidado" são: papelão, couro, bolor, deteriorado e agressivo. Esses termos seguem a padronização aceita internacionalmente e denominada de Roda do Sabor ("Flavor Wheel") (Meilgaard, 1979); essa padronização foi um trabalho conjunto dos órgãos internacionalmente reconhecidos na área de produção de cerveja. Apesar da padronização existente, dados válidos de análise sensorial de cervejas são raros, segundo o mesmo Meilgaard (2001), que avalia os estudos publicados em estabilidade sensorial de cerveja como sendo de baixa confiabilidade devido à ausência de análise estatística adequada. A mesma fragilidade dos resultados sensoriais reportados é mencionada por Bamforth (2004). Listas extensas, mas não definitivas, desses compostos carbonílicos, analisados por cromatografia, e sua influência sobre o sabor de envelhecimento da cerveja foram publicadas. Os compostos mais citados com aumento de concentração devido à oxidação do produto são: acetona, *t*-2-butenal, 3-hidrobutanal, isobutenal, 2-metilbutanal, dietilsuccinato, etilfenilacetato, isovaleral, benzaldeído, 2-fenilacetaldeído, *t*-2-heptenal, octanal, *t*-2-octenal, 3-hidroxinonanal, *t*-2-nonenal (T2N), *t*-2,4-decadienal e *t*-2,4-undecadienal, γ -nonalactona, 2-acetilfurano, 2-propionilfurano, 5-hidroximetil furfural (5HMF), 5-metil-2-furfural, 2-furfural, acetato de furfurila (Meilgaard, 1975; Barker et al., 1983; Narziss et al., 1986; Narziss et al., 1993; Harayama et al., 1994; Sakuma & Kowaka, 1994; Walters et al., 1997; Bamforth, 2000). Trabalhos mostrando as análises estatísticas de regressão linear mostraram que os compostos com melhor correlação em relação à formação de sabor oxidado são 5HMF (Shimizu et al., 2001; Bravo et al., 2002) e furfural (Ogane et al., 2000; Shimizu et al., 2001). Entre os poucos trabalhos que avaliam estatisticamente a formação de carbonilas com a oxidação da cerveja, Foster et al. (2001) destacaram com análise multivariada a formação dos seguintes compostos em cerveja Pilsen Light: 2-furfural, acetal, 5HMF, *t,t*-2,4-hexadienal, γ -nonalactona, *t,t*-2,4-decadienal e 1-heptanol.

Harayama et al. (1995) avaliaram a sinergia entre T2N e 2-furfuril-etil éter (2-FEE), concluindo que o sabor de papelão não era notado ante a presença de somente um dos compostos. Em um trabalho com bom detalhamento estatístico dos resultados de análise sensorial, Guyot-Declerck et al. (2005) mostraram que os teores dos compostos DMS (dimetil-sulfeto), T2N e metional aumentam com o envelhecimento da cerveja, e tem boa correlação com a análise sensorial descritiva feita por provadores treinados. Mais recentemente, Techakriengkrai et al. (2006) mostrou que os teores de T2N e 5HMF aumentam em paralelo ao aumento da nota de envelhecimento dada pela equipe de provadores. Na modelagem matemática para prever a nota de envelhecimento a partir dos resultados de teores de T2N e 5HMF, a maior contribuição estatística foi do T2N. Guyot-Declerck et al. (2005) cita que o pH da cerveja que, normalmente se encontra em torno de 4,0, tem influência sobre a formação do T2N durante o envelhecimento, sendo ideais valores entre 4,2 e 4,6. Callemien et al. (2006) citam, entre outros compostos já citados acima, a presença de 4-vinil-syringol como um composto presente na cerveja Pilsen submetida ao processo de envelhecimento.

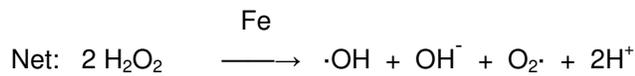
Os compostos carbonílicos são provenientes das seguintes reações químicas: (a) auto-oxidação de ácidos graxos insaturados, (b) condensação aldólica, (c) degradação Strecker de aminoácidos, (d) degradação de iso- α -ácidos, (e) oxidação de álcoois superiores, intermediada por melanoidinas, (f) degradação enzimática de lipídeos (Bamforth, 2000; Narziss, 1986; Hashimoto, 1981). Bamforth (2000) mostrou que a ocorrência mínima dessas reações é suficiente para a formação de baixíssimas quantidades desses compostos carbonílicos, já acima de seus limiares de detecção, alterando o sabor da cerveja. Portanto a formação do sabor de oxidado seria inevitável, cabendo ao cervejeiro apenas retardar ou minimizar esse processo, posição afirmada também por Axcell & Torline (1998). Kaneda et al., utilizando análises de quimiluminescência (CL) (1990) e ressonância de spin de elétrons (ESR) (1988), evidenciaram a presença de radicais livres no processo de oxidação da cerveja, fenômeno confirmado por Uchida et al. (1996). Kaneda et al. (1999) propuseram a seguinte seqüência de reações para a oxidação da cerveja durante a estocagem (Figura 2-1): inicialmente o oxigênio triplete ($^3\text{O}_2$) é convertido pela ação da luz, calor ou catálise por metais, em oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou radicais superóxido (O_2^-) ou hidroperóxido ($\bullet\text{OOH}$), que são as chamadas "espécies reativas de oxigênio" (ERO). Em reações catalisadas por metais como ferro (Reações de Fenton) e cobre (Reações de Haber-Weiss) o H_2O_2 e o O_2^- são transformados em radicais hidroxila

(\bullet OH), que é uma ERO ainda mais reativa. São esses radicais que reagem com os componentes da cerveja, como polifenóis, álcoois, ácidos graxos, açúcares e iso-humulonas levando à formação das carbonilas responsáveis pelo sabor oxidado. Os radicais fornecem energia química para as reações químicas de formação dos compostos carbonílicos.

Os danos causados ao sabor da cerveja pela formação dos compostos carbonílicos nas fases do processo de produção anteriores ao envasamento, apesar de citados como importante por alguns autores (Narziss et al., 1986 e 1993; Drost et al., 1990; Maeda, 1999; Noël, 1999; Liegeois, 1999), são considerados desprezíveis se comparados aos danos causados pela formação desses compostos durante a estocagem (Bamforth, 2000 e 2004; Meilgaard, 2001). Isso se deve à ação redutora da levedura e à produção de SO_2 durante a fermentação. Vários fatores influenciam as reações citadas acima, e serão abordados em seguida.



reação B: reação de Fenton



reação C: reação de Haber-Weiss catalisada por Ferro

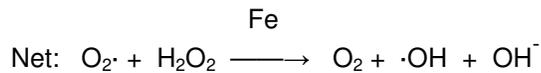
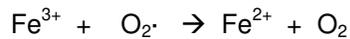


Figura 2-1. Esquema da formação dos radicais livres responsáveis pelas reações de oxidação dos compostos da cerveja (Kaneda et al., 1999).

2.2 Atributos sensoriais da oxidação

Na indústria cervejeira como um todo, se utiliza o termo “oxidação” de maneira genérica para representar a perda do frescor da cerveja. Com a tendência mundial de se comercializar cervejas Pilsen muito leves, o frescor está diretamente associado à leveza do produto. Existe pouco consenso e poucos dados estatisticamente válidos para apontar de forma definitiva quais são as alterações sensoriais que ocorrem com o envelhecimento da cerveja. Em 1971, Drost e colaboradores (Hashimoto, 1981) apontaram cinco estágios para descrição do envelhecimento da cerveja:

- estágio 1: aroma doce
- estágio 2: pesada, aroma doce como passas, ácido e desagradável
- estágio 3: idem estágio 2 + mel
- estágio 4: aroma pungente, papelão, couro
- estágio 5: aroma doce, uísque, oxidado

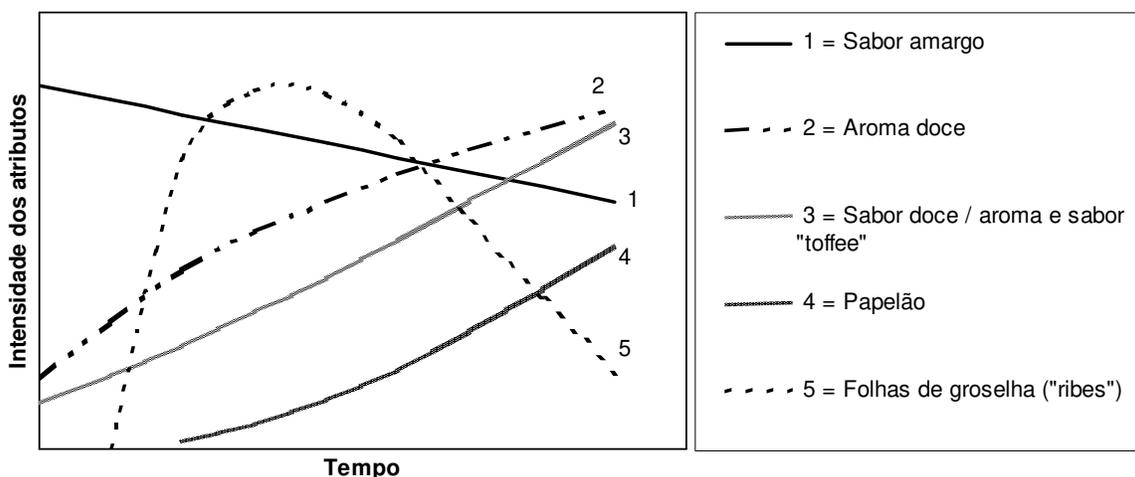


Figura 2-2. Variação da intensidade dos atributos da cerveja com o envelhecimento (Hashimoto, 1992)

Em 1972, Meilgaard (citado por Hashimoto, 1981) descreveu o aumento dos seguintes atributos como sendo característico do envelhecimento da cerveja: papelão, papel, pão, adstringente, doçura, madeira, couro. Em 1977, Dalgliesh (citado por

Hashimoto, 1992) fez o primeiro diagrama qualitativo e empírico com as mudanças sensoriais ocorridas na cerveja devido ao envelhecimento (Figura 2-2).

Em 1979, Dalgliesh e Clapperton (citado por Hashimoto, 1992) descreveram o desenvolvimento de sabor doce (caramelo, toffee, açúcar queimado) durante o envelhecimento, principalmente em cervejas claras. Atualmente bastante difundida, a Roda dos Sabores (Meilgaard et al., 1979) foi o resultado da cooperação entre a ASBC (American Society of Brewing Chemists), EBC (European Brewing Convention) e MBAA (Master Brewers Association of the Americas), e classificou todos os atributos sensoriais da cerveja, sendo a oxidação parte da classe 8:

Classe 8: Oxidado, envelhecido, bolor

0800 Velho (stale): cerveja velha, super pasteurizada

0810: Folhas de groselha ("ribes"), planta de tomate

0820: Papelão, pão, casca de pão velho

0830: Couro, madeira não cortada

0840: Bolor (adega, madeira)

De acordo com Whitear (1980), cervejas leves desenvolvem, durante o envelhecimento, uma nota de papelão acompanhado por envelhecido (stale) e metálico. Hashimoto (1981) descreveu o envelhecimento com: perda de frescor, oxidado, amargor desagradável, amargor residual, adstringência, caramelo, bolor, sulfurado. Andrews (1986) relatou, para vários tipos de cerveja, os atributos na ordem em que foram percebidos pelos provadores treinados, durante 12 meses de vida de prateleira: poeira, aroma a gato ("catty"), papel, papelão, pesado, grão, pão, cozido, super-pasteurizado, caramelo, mel, perfumado. Em 1989, Ryder & Siebel (citado por Hashimoto, 1992) adicionaram novos termos para descrever as alterações de sabor com o envelhecimento da cerveja. Observaram um aumento de aroma doce (caramelo), de aldeído/cidra, de papelão, e da aspereza, bem como uma redução do gosto amargo, do SO₂ / levedura, e do aroma de lúpulo e cerveja frescos. Relataram também que o atributo groselha ("ribes") é raro em cervejas comerciais tipo lager. Hashimoto (1992) descreveu os termos em inglês "ribes" (folhas de groselha, caule e folhas de planta de groselha amassadas, planta de tomate) e "catty" como sinônimos de cerveja oxidada. Narziss e colaboradores (1993) levantaram a tendência de alguns atributos com o envelhecimento da cerveja: diminuem o aroma de lúpulo e de levedura/éster; aumentam o aroma a papel/papelão, pão/cracker,

caramelo e groselha. Furusho et al. (1999) relataram o envelhecimento como sendo a presença dos atributos envelhecido (oxidado, melaço, uísque), papel (papelão, pão), couro (caramelo, toffee), amargor deteriorado e “impressão geral de envelhecimento”. Adriana Bravo et al. (2002), num dos poucos trabalhos com detalhamento estatístico adequado, avaliaram os atributo com grande variação em relação à cerveja controle (fresca): foram eles pão, papel, queimado, caramelo, aroma e gosto doce.

2.3 Variáveis influentes sobre a oxidação da cerveja na garrafa

2.3.1 Uso de antioxidantes

Os antioxidantes de uso corrente na indústria cervejeira são ácido iso-ascórbico (AIA) (ou ácido eritrórbico), ditionito de sódio e metabissulfito de sódio (NaMS) ou potássio (KMS). São usados, principalmente, produtos comerciais cuja composição é uma mistura de dois ou mais desses compostos citados. Outras substâncias já foram reportadas como antioxidantes para cerveja, porém ainda não encontraram aplicação industrial. Sistemas enzimáticos glicose-oxidase / catalase foram testados (Hashimoto, 1981; Hartmeier, 1979) e, inclusive, patenteados, com bons resultados (Moretti, 1998). Alguns polifenóis são mencionados como tendo a capacidade de quebrar a propagação de radicais livres, porém não foram efetivos em eliminar a formação de sabor oxidado (Hashimoto, 1981; Andersen et al., 2000). H_2O_2 e hidroperóxidos são as únicas ERO (espécies reativas de oxigênio) estáveis por tempo suficiente para serem seqüestradas; os sistemas antioxidantes devem, então, focar nessas espécies ou na quelação de metais (Andersen et al., 2000). Walters et al. (1997) mostraram que as catequinas tem ação efetiva em reduzir a formação de compostos carbonílicos mas não evitam a formação de sabor oxidado. As melanoidinas formadas na secagem do malte e na fervura do mosto são relatadas como tendo efeito tanto pró-oxidante quanto antioxidante (Bamforth, 2001; Savel, 2001). Bravo et al. (2002) menciona o uso de aminoguanidina como tendo ação sobre um intermediário, inibindo a formação de 5-hidroximetil furfural (5HMF).

A ação antioxidante do AIA é explorada também em outros alimentos e bebidas: funciona como seqüestrante de oxigênio, doador de íons H^+ e quelante de metais. O AIA atua também como pró-oxidante, catalisando a redução de íons Fe^{3+} para Fe^{2+} , que por

sua vez promove a formação de radicais livres a partir de H_2O_2 , não sendo portanto um antioxidante de grande eficiência (Andersen et al., 2000; Bamforth, 2001). O seqüestro do oxigênio do meio pelo AIA resulta na formação de ácido iso-dehidroascórbico e também na formação de H_2O_2 , que é uma ERO (Gregory, 1996). Hashimoto (1981) reportou que na presença de íons Fe^{2+} o AIA inibe completamente a oxidação de iso-humulonas. Dadic (1984) menciona que o AIA pode proteger os compostos fenólicos da oxidação, preservando o sabor da cerveja. Noël et al. (1999) e Liegeois et al. (1999), ao contrário, mostram que o ácido ascórbico aumenta a oxidação de polifenóis; o SO_2 é o composto que evita essa oxidação. Concluem que a presença de polifenóis na cerveja diminui a disponibilidade de SO_2 no meio, diminuindo a proteção da cerveja.

Segundo outros autores, a presença de SO_2 é a melhor maneira de prevenir a formação de sabor oxidado na cerveja (Bamforth, 2000 e 2004; Hughes, 2000; Andersen et al., 2000). No pH da cerveja, 98% do SO_2 se encontra na forma de íons bissulfito (Hughes, 2000; Bamforth, 2000). O SO_2 interage com compostos carbonílicos, tendo maior afinidade pelos de menor peso molecular, como é o caso do acetaldeído; portanto, cervejas com mais acetaldeído diminuem o efeito protetor do SO_2 sobre os demais aldeídos formadores do sabor oxidado. O SO_2 , além de poder ser adicionado à cerveja na forma de ditionito ou metabissulfito de sódio ou de potássio, é também formado durante a fermentação da cerveja. Um dos problemas com a dosagem de SO_2 livre, que não deve ultrapassar 10 ppm, é o seu aroma indesejado no produto. A formação de agregados SO_2 -aldeído leva alguns autores a concluir que os compostos formadores do sabor de oxidação não são formados na cerveja envasada e sim desprendidos ou desmascarados pelo rompimento do agregado com o SO_2 (Bamforth, 2000; Ilett & Simpson, (1995); Barker et al., 1983). Segundo Andersen, (1998) e Chapon, (1981), o SO_2 se combina com o H_2O_2 , evitando sua decomposição em radicais livres. Durante a fermentação, não somente o SO_2 atua como antioxidante; a própria levedura tem forte ação antioxidante (Bamforth, 2004). Drost et al. (1990) adicionaram 1 ppm de T2N à cerveja 24h após sua inoculação; a ação redutora da levedura fez com que o T2N não pudesse ser detectado na cerveja ao final da fermentação. O mascaramento sensorial da presença do T2N seria feito também por proteínas, segundo Callemien et al. (2006); com a queda do pH da cerveja durante o envelhecimento, esses agregados T2N-proteína seriam hidrolizados e o T2N passaria a ter notado seu efeito sensorial indesejado.

A mistura de AIA e SO_2 é eficiente na prevenção da oxidação da cerveja, fenômeno explicado pela teoria da sinergia dos efeitos dos antioxidantes. Hashimoto (1981) cita que a mistura de 15 ppm de KMS e 100 ppm de AIA é ideal. Klimovitz & Kindraka (1979) definiram na cervejaria Stroh a relação ideal da mistura como sendo 40 KMS : 60 AIA.

2.3.2 Teor de oxigênio dissolvido

Owades & Jakovac (citado por Chapon, 1981 e Hashimoto, 1981), utilizando isótopo ^{18}O para verificar o mecanismo de consumo de oxigênio durante a oxidação, concluíram que todo o oxigênio da fase gasosa da embalagem é consumido no processo de oxidação (65% na oxidação de polifenóis; 30% na formação de compostos carbonílicos; 5% na formação de compostos de amargor). Reforçando esse resultado, cervejas que tiveram os polifenóis removidos por adsorção apresentaram melhor estabilidade de sabor (citado por Chapon, 1981 e Hashimoto, 1981). Em contrapartida, Noël et al. (1999) utilizando ^{18}O em grande quantidade (104 ppm), reportaram que o O_2 dissolvido não é incorporado na formação das carbonilas. Segundo Chapon (1981), o agente oxidante é o oxigênio molecular, mas os substratos não são auto-oxidáveis (não reagem ou reagem muito lentamente com o O_2 molecular); requerem a intervenção de catalisadores que são essencialmente metais de transição, ferro e cobre, como íons simples ou complexos.

De acordo com a experiência prática deste autor, as cervejarias brasileiras e internacionais mais avançadas em termos de controle dos níveis de oxigênio dissolvido na cerveja trabalham com especificação de máx. 80 ppb na cerveja recém filtrada (sem antioxidante) e máx. 200 ppb de oxigênio total (dissolvido + gasoso) na cerveja recém envasada. Essas especificações vêm se tornando cada vez mais rígidas nos últimos anos, e implicam em investimentos para medição de oxigênio dissolvido em linha, blendagem eventual de cerveja fora de especificação (perda de produtividade) e, principalmente, risco de desabastecimento das linhas de envasamento (e eventualmente até do mercado) por falta de cerveja dentro das especificações na entrada da enchedora. Os trabalhos realizados para avaliação do efeito do teor de oxigênio dissolvido e/ou do volume de ar no "headspace" são, por via de regra, experimentações tipo univariável. O primeiro trabalho com níveis de oxigênio dissolvido próximos da realidade atual foi

realizado em 1976 (Hashimoto, 1981) e avaliou cervejas com 0,5, 2,5, 4,5 e 9,5 mL de ar (equivalente a 220, 1100, 2000 e 4200 ppb de oxigênio dissolvido), concluindo que as reações oxidativas aumentam com o teor de oxigênio dissolvido na garrafa, apesar dessas reações acontecerem mais tarde, mesmo sem a presença de oxigênio molecular. Outros autores também mostram que quantidades ínfimas de oxigênio dissolvido são suficientes para desencadear o processo de oxidação da cerveja, que acontecerá independentemente do teor de oxigênio (Brenner & Stern, 1970; Furusho, 1999; Kaneda et al., 1999; Bamforth, 2000). Narziss et al. (1993) compararam a formação de compostos carbonílicos em dois níveis muito afastados de concentração de oxigênio: 270 e 5400 ppb. O trabalho na cervejaria Stroh de Klimovitz & Kindraka (1979) para otimização do sistema antioxidante usou cervejas contendo entre 250 e 450 ppb de oxigênio dissolvido, porém essa não foi uma variável independente do experimento. Furusho (1999) relatou não haver diferença sensorial entre cervejas com 160 e 420 ppb de oxigênio dissolvido. Liegeois et al. (1999) concluíram que, acima de 100 ppb de oxigênio dissolvido, o aumento da concentração de O₂ não leva a uma maior formação de trans-2-nonenal (indicador de papelão), nem no envelhecimento forçado (40°C), nem no natural (20°C). Ogane et al. (2000) produziram cervejas com 0,3; 0,6; 0,9; 1,5; 2,0 mL de ar (132, 264, 396, 660, 880 ppb), porém não foram tiradas conclusões sobre o efeito do oxigênio dissolvido na oxidação da cerveja. Corzo & Bracho (2002) modelaram a previsão da estabilidade sensorial com base na temperatura de estocagem e no teor de oxigênio dissolvido ajustado para 20 ou 200 ppb. Bamforth (2004) menciona, sem contudo mostrar dados, que a redução dos teores de oxigênio dissolvido na cerveja tem maior importância que todos os procedimentos realizados na cervejaria antes da etapa de filtração do produto.

2.3.3 Metais e polifenóis

O mecanismo da influência dos metais no processo de oxidação foi detalhado no item 2.1. Os metais de maior importância são ferro e cobre e estão presentes na cerveja nas concentrações de 0,02 a 0,34 mg/l e 0,02 a 0,78 mg/l, respectivamente. As fontes desses metais são a água utilizada, o malte e o lúpulo, as tubulações e principalmente, os auxiliares de filtração (terra diatomácea e perlitas). Em geral, monitora-se os níveis de ferro na água proveniente das tubulações de aço carbono, mas os níveis de cobre não são monitorados, pois as cervejarias modernas não têm equipamentos feitos desse metal.

Chapon (1981) afirma haver efeito sinérgico entre ferro e cobre quando presentes na cerveja.

Com relação aos polifenóis, sua presença na cerveja origina-se do malte e do lúpulo utilizados. Os polifenóis consomem 65% do oxigênio presente no "headspace" da cerveja (Owades & Jakovac, citado por Chapon, 1981 e Hashimoto, 1981), mas sua participação como protetor natural da cerveja contra a oxidação ainda não está totalmente esclarecida (Bamforth, 2001). Em termos práticos, as cervejarias buscam um determinado teor de polifenóis em sua cerveja para evitar a turvação do produto no mercado devido à formação de complexos de polifenóis com proteínas. Por isso, algumas plantas estabilizam a cerveja com PVPP (poli-vinil-poli-pirrolidona), que adsorve parte dos polifenóis (principalmente os antocianogênicos); outras plantas estabilizam a cerveja retirando proteínas. O sistema mais eficiente de estabilização coloidal é a eliminação combinada tanto de proteínas como de polifenóis. Contudo, não está claro qual desses processos é mais adequado para a estabilidade sensorial da cerveja.

2.3.4 Temperatura

Como em qualquer reação química, a temperatura afeta também a velocidade das reações de oxidação da cerveja; pela Lei de Arrhenius, as taxas de reação dobram a cada 10°C de aumento de temperatura de estocagem. A temperatura de estocagem da cerveja é a variável de mais difícil controle pelas cervejarias e uma das maiores causas de variação da qualidade sensorial do produto no mercado. Em países de dimensões continentais como o Brasil, a cerveja é transportada em caminhões para longas distâncias por períodos de dias e dias. Não temos uma cadeia refrigerada de transporte e nem estocagem refrigerada nos grandes pontos de venda, o que torna inaplicáveis em nossa realidade os estudos realizados em países que dispõem de sistema de distribuição refrigerada. Vários estudos técnicos avaliaram a estabilidade sensorial da cerveja em relação à temperatura; Hashimoto (1981) estocou cervejas a 8 e 30°C e concluiu que o efeito da temperatura sobre a oxidação da cerveja era mais importante que o efeito do ar presente no headspace. Bamforth (2000 e 2004) também cita a temperatura como sendo de alta relevância sobre a estabilidade sensorial, mostrando que a meia vida do SO₂ na cerveja é de 27 dias a 40°C e de 3 anos a 0°C. Contudo, não há trabalhos mostrando estatisticamente quanto a temperatura é mais relevante que os outros fatores que influenciam a estabilidade sensorial.

A pasteurização é a etapa do processo que diferencia a cerveja do chope. Cerveja é o chope pasteurizado, seja por flash pasteurização ou pasteurização em túnel (Figura 2-3).

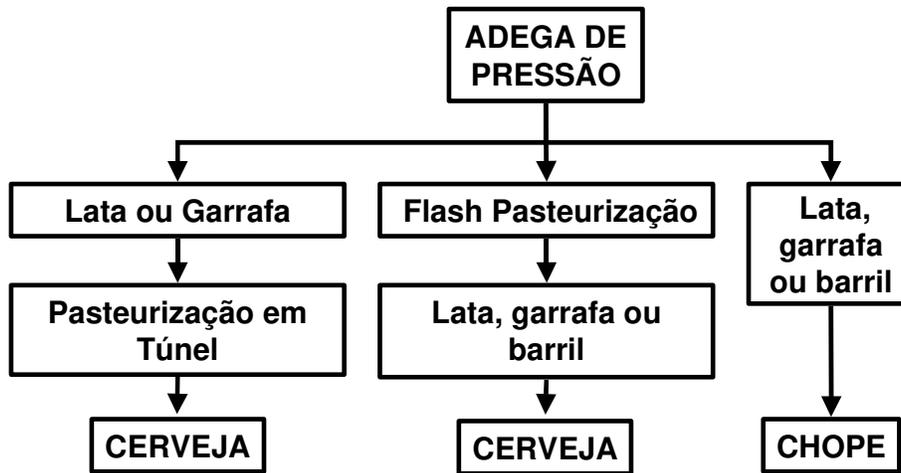


Figura 2-3. Diferenciação entre as etapas do processo para a produção de chope e de cerveja.

Esse processo é controlado nas cervejarias pelo número de Unidades de Pasteurização (UP) aplicadas ao produto. Uma UP equivale a submeter a cerveja a uma temperatura de 60°C durante um minuto. O mesmo número de UP pode ser conseguido submetendo-se uma cerveja a temperatura mais alta por um período mais curto. De acordo com dados empíricos obtidos para cervejas, cada aumento de 7°C na temperatura de pasteurização representa um aumento de 10 vezes na taxa de inativação celular (Fator Z); testes de laboratório com cerveja envasada indicaram que 5-6 UP são efetivos para atingir a esterilidade da cerveja, mas para obter uma margem maior de segurança, a faixa de 15-30 UP é geralmente adotada pelas indústrias (Kaneda *et al.*, 1994). Wackerbauer & Zufall (1998) mostraram que a cerveja sofre menor oxidação quanto menor for o tempo de exposição a altas temperaturas, sendo favorável, portanto, o processo de flash-pasteurização, sendo uma das justificativas o fato de que a cerveja na linha tem menor teor de oxigênio dissolvido do que na garrafa. O processo de pasteurização mais utilizado é a pasteurização túnel, onde a linha de transporte de garrafas ou latas contendo cerveja envasada atravessa um túnel com esguichos (ou chuva) de água à temperatura de cerca de 60°C. Para atingir, por exemplo, 10 UP, as garrafas levam 10 minutos para atravessar a região de pasteurização. Para evitar perda de qualidade sensorial, a cerveja deve deixar o pasteurizador à temperatura próxima da ambiente. Antes da zona de pasteurização existe uma zona de aquecimento e após, uma zona de resfriamento gradual da cerveja,

que reduzem o choque térmico e a conseqüente quebra de garrafas. Nas zonas de aquecimento e resfriamento também ocorre alguma pasteurização e isso deve ser considerado no número total de UP recebidas pela cerveja. A pasteurização túnel resulta em alta segurança contra contaminação microbiológica, pois a cerveja já está fechada em sua embalagem quando recebe o calor. Outro processo em uso por algumas cervejarias é a flash pasteurização, que consiste em aquecer a cerveja a cerca de 74°C por cerca de 10 segundos, conseguindo-se o mesmo efeito sobre a cerveja em termos de UP. Como somente o líquido (cerveja) está pasteurizado, é necessário um envase asséptico para evitar a recontaminação do produto.

Segundo Kaneda *et al.* (1994), o processo de pasteurização acelera a formação de radicais livres e a oxidação da cerveja; neste trabalho a cerveja pasteurizada com 15, 20 e 30 UP mostrou envelhecimento equivalente a 6, 8 e 10 dias a 20°C, respectivamente.

2.3.5 Luminosidade e agitação

Apesar de serem fatores físicos presentes constantemente durante o tempo de vida de prateleira da cerveja, poucos trabalhos exploram com rigor estatístico o efeito da incidência de luz e da agitação / vibração sobre a oxidação de cervejas. Tratando de efeito da luz, existem diversos trabalhos publicados tratando do tema da oxidação à luz (“lightstruck”), que é a reação descrita em item anterior onde os alfa-ácidos são oxidados formando mercaptanas.

Chapon (1981) descreve que a luz incidente é absorvida por substâncias marrons (melanoidinas e derivados de polifenóis) e por substâncias fotossensíveis da cerveja (incluindo a riboflavina). Da absorção de luz resulta a formação dos radicais livres responsáveis pela formação das espécies reativas de oxigênio, que degradam os compostos da cerveja formando os compostos carbonílicos. Afirma que, mesmo em presença de luz difusa, a taxa de oxidação é muito maior do que no escuro completo. Como regra geral, a luz pode ser mais importante para a taxa de oxidação da cerveja do que a catálise por íons metálicos.

Narziss (1993) cita que a incidência de luz é extremamente prejudicial para a estabilidade sensorial da cerveja, mas seus dados práticos não demonstram isso com clareza. Takashio e Shinotsuka (2001) descrevem o sistema de produção anti-oxidativo da cervejaria japonesa Saporu e citam que o uso de caminhões fechados para transporte

e entrega de cerveja aumentou a percepção de frescor da cerveja no mercado. Bordeleau e colaboradores patentearam (Labatt, 2003) um processo de decomposição da riboflavina durante a produção do mosto da cerveja, o que resultou numa maior estabilidade sensorial do produto em relação à incidência de luz.

Com relação à influência da agitação do transporte sobre a estabilidade sensorial, Narziss (1993) mostra que a agitação durante 24h tem grande influência sobre a quantidade de compostos carbonílicos formados e sobre a intensidade do sabor de envelhecimento, mas não mostra detalhes sobre os parâmetros de agitação usados.

2.4 Experiência prática do autor na cadeia de distribuição de cerveja no Brasil e no exterior

Este autor trabalhou por três anos no estudo de toda a cadeia de transporte e estocagem de cerveja, desde sua saída da cervejaria até a venda final ao consumidor. O objetivo final do trabalho era a redução do número de devoluções de cervejas pelos consumidores com a reclamação de que o produto estava com sabor alterado, que como já mencionado anteriormente nesse texto, representava 70% dos problemas relatados com o líquido no interior das embalagens. Parte do trabalho foi a troca de experiências práticas com cervejarias nos Estados Unidos e na África do Sul. Este último país possui características de distribuição e venda muito similares ao Brasil e muitas ações foram implementadas com base no sucesso obtido pela cervejaria naquele local.

Na cadeia de distribuição se deseja que a cerveja receba a menor incidência possível de: radiação UV (luz), temperaturas elevadas, choque térmico, vibração (transporte e manuseio). Com esse objetivo se analisou a cadeia de distribuição brasileira, onde foram encontrados os seguintes problemas:

- Transporte de cerveja para longas distâncias: nosso país tem dimensões continentais, com determinados tipos de produto ou embalagem sendo produzidos em apenas algumas localidades, por serem especiais e/ou de volume reduzido de consumo. Isso acarreta exposição da cerveja a vibrações excessivas e temperaturas elevadas.
- Qualidade precária de algumas estradas: eleva-se o tempo de exposição do produto ao calor e eleva-se muito a vibração decorrente do transporte.

- Tipos inadequados de caminhões: os caminhões devem, idealmente, ser fechados para evitar a incidência de luz e arejadas o suficiente para evitar o efeito estufa no interior da carga (algumas medições indicaram temperaturas acima de 50°C sob a lona de caminhões tipo carga seca ou “truck”). O ideal são caminhões tipo asa delta, tipo baú ou tipo “sider” (coberto e com lonas laterais tipo cortina). As cervejarias e revendedores investem nesse tipo de caminhões, mas não atingem 100% da frota, principalmente nos meses de alto giro do produto (verão) onde se necessita de caminhões de terceiros para garantir a logística de distribuição.
- Distribuidores com espaço de estocagem inadequado: armazéns muito pequenos expõem o produto à incidência de luz solar direta. Em alguns casos a temperatura ambiente atinge mais de 45°C por efeito do tipo de cobertura. O ideal seriam armazéns totalmente fechados e climatizados, mas estamos muito longe dessa realidade.
- Tempo de espera prolongado para descarregamento do produto em grandes redes de supermercados: o caminhão necessita chegar cedo para pegar lugar na fila de descarregamento, mas a espera é longa e o veículo fica sob a incidência de raios solares durante horas, recebendo luminosidade e calor excessivos.
- Distribuição aos pontos de venda com caminhões abertos: a entrega ao varejo nas ruas é muitas vezes feita em caminhões abertos, que expõem o produto à ação dos raios solares e da chuva.
- Estocagem inadequada no ponto de venda: existem pontos de venda na praia que usam caixas de cerveja com garrafas cheias de produto, para construção de paredes provisórias. A incidência de luz e calor é direta e danosa à qualidade da cerveja. Outros casos incluem a guarda do produto próximo a lugares quentes (fornos, motores) ou sob iluminação artificial direta e próxima (vitrines e prateleiras).
- Não observação da data de validade como critério logístico: o primeiro produto que entra deve ser o primeiro a sair. Muitas vezes isso não é observado pelo distribuidor e pelo ponto de venda. A idade do produto no mercado está diretamente relacionada com a intensidade do sabor oxidado / envelhecido.
- Equipe de distribuição sem conhecimento: todo o efeito nocivo do calor, vibração e luminosidade sobre a qualidade da cerveja não é de conhecimento pleno dos motoristas, entregadores, distribuidores, donos e funcionários de pontos de venda.

Esse conhecimento faria com que ações possíveis fossem executadas para a manutenção da qualidade da cerveja.

Como parte do trabalho de redução das devoluções, foram visitadas cervejarias em outros países (Alemanha, África do Sul e Estados Unidos). O autor destaca as seguintes práticas adotadas nesses países para melhoria da qualidade do produto no momento do consumo:

- Cadeia de distribuição e estocagem refrigeradas: armazéns climatizados, caminhões com isolamento térmico e totalmente fechados.
- Equipe técnica para fiscalização e treinamento do pessoal envolvido na cadeia: pessoal capacitado pela cervejaria em visita e treinamento constantes para distribuidores, vendedores, transportadores e pontos de venda.

2.5 Prática corrente da análise sensorial nas cervejarias

De maneira geral, as cervejarias realizam a análise sensorial de rotina de forma pouco científica. A chamada “degustação” é feita nas fábricas quase que exclusivamente pelos cervejeiros, que tem muitas outras atribuições de rotina além de avaliar sensorialmente as cervejas. O número de cervejeiros em cada sessão é de dois ou três, na maioria das vezes, ocorrendo também de estarem presentes mais cervejeiros ou até da análise ser feita por um só provador. Raramente se avaliam esses resultados estatisticamente, devido ao desconhecimento e ao baixo número de provadores. Muitas vezes a análise não é individual, existindo influência da opinião de outros provadores antes da avaliação. Em algumas plantas, o local de análise sensorial não possui cabines nem iluminação adequados. A análise sensorial realizada dessa maneira tem sua eficácia comprometida ou até sub-aproveitada. Não deixa de ser importante, todavia, porque se trata de um controle complementar aos demais controles de laboratório e aos controles de processo para garantia da qualidade. Na maioria das vezes, um lote ou um tanque de cerveja só é liberado para envasamento após a análise sensorial do cervejeiro, mesmo que seja de um apenas. Em cervejarias menores essa liberação é importantíssima, pela carência de resultados analíticos gerados pelo laboratório, que tem limitações de equipamentos e recursos.

Algumas cervejarias treinam mais provadores além dos cervejeiros, o que permite uma análise estatística mais adequada. Muitas possuem instalações adequadas,

com cabines, iluminação, climatização, ausência de odores estranhos e ausência de ruídos. Existem poucos casos de equipes externas à cervejaria para análise sensorial da cerveja. O teste estatístico mais realizado em cervejarias é o triangular, geralmente aplicado com o número de seis provadores, para detecção de problemas em um lote específico sob suspeita de qualidade. Equipes de análise descritiva quantitativa são raras; geralmente são de grandes grupos cervejeiros e estão alocados nos escritórios centrais onde fica a equipe técnica que coordena as diferentes plantas. Muitos trabalhos científicos relacionados à estabilidade sensorial de cervejas descrevem que suas amostras foram avaliadas por uma equipe de provadores treinados. Não se encontra nestes trabalhos a validação estatística dos resultados gerados por essa equipe. Trabalha-se simplesmente com as médias das notas de intensidade dos atributos. Esses trabalhos refletem um pouco do que é a realidade das equipes de provadores das cervejarias.

É comum se suspeitar de que a cerveja esteja oxidada durante a análise sensorial de liberação para o mercado de lotes de cerveja envasada. Chega-se a essa suspeita porque um ou mais provadores perceberam o sabor oxidado durante a análise, ou porque ocorreram problemas no processo de produção, como uma superpasteurização (número de UP's acima do limite) ou um teor de oxigênio dissolvido acima do limite. A decisão é de extrema importância: o erro implica em despejar o produto desnecessariamente, gerando prejuízos, ou liberar um produto com problema de sabor para o mercado, resultando em reclamações e prejuízo para a percepção da qualidade do produto pelo mercado. O critério usado atualmente na maioria das cervejarias é extremamente subjetivo, baseado muitas vezes na opinião de um só cervejeiro. Outras vezes se reúnem cervejeiros de uma planta para a decisão e, em alguns casos nas cervejarias maiores, se submetem amostras do produto para avaliação de uma equipe técnica corporativa de cervejeiros. Mesmo nesses casos, a decisão é subjetiva, pois não se conhece exatamente qual será a aceitação do consumidor para o produto em questão. Ocasionalmente se libera o produto para um mercado de alto giro, como os grandes supermercados, objetivando um consumo mais rápido e um risco menor de agravamento do atributo de oxidação.

3 Materiais e métodos

Este trabalho de tese se constitui de duas etapas distintas e complementares entre si. Na primeira etapa foi definido um modelo matemático para previsão da aceitação do consumidor em relação a cervejas oxidadas. As respostas de provadores treinados para os atributos papelão, caramelo e metálico foram usadas como parâmetros do modelo matemático.

Na segunda etapa, cervejas foram envelhecidas por ação forçada da temperatura, da incidência de luz e da agitação. A partir dos resultados da análise sensorial de provadores treinados de uma grade cervejaria comercial brasileira, foi possível modelar os resultados de aceitação, que foram comparadas com a aceitação real de consumidores em relação aos mesmos produtos.

Como consequência das duas etapas foi possível avaliar o efeito dos parâmetros de envelhecimento (temperatura, luz e agitação) sobre a aceitação do consumidor.

3.1 Cerveja utilizada

Como cerveja fresca utilizada para a produção de referências de treinamento e preparo de amostras para testes descritivos e afetivos, foi utilizada uma cerveja tipo Pilsen líder no mercado brasileiro. Foram adquiridas garrafas tipo A (600 ml) no mercado local de Campinas, com o critério de possuírem idade menor que 20 dias. Após a aquisição as amostras foram mantidas em câmara fria a 5°C até o momento do uso. As cervejas não permaneciam por mais de 15 dias na câmara até que necessitassem ser utilizadas. Para os testes em diferentes momentos deste trabalho, sempre se adquiria mais cerveja fresca no mercado, dentro dos critérios descritos. Constava do rótulo das cervejas utilizadas os seguintes ingredientes: água, malte, cereais não-malteados, lúpulo, estabilizante INS 405 (alginato de propileno glicol) e antioxidante INS 300 (ácido ascórbico).

As análises padrão para caracterização da cerveja foram feitas pelo laboratório de uma das principais cervejarias nacionais, seguindo procedimentos de rotina em prática para as cervejas produzidas e enviadas para o mercado. A Tabela 3-1 detalha as

características da cerveja utilizada. Essa caracterização foi realizada de acordo com os procedimentos padrão da AOAC (1997).

Tabela 3-1. Caracterização da cerveja utilizada para os testes.

Parâmetro	Valor
Extrato primitivo	10,94 ºP
Extrato aparente	2,42 ºP
Extrato real	4,06 ºP
Grau de fermentação total	82,48 %
Teor alcoólico	4,5 % v/v
Cor	5,54 EBC
Teor de CO ₂	0,62 %
Amargor	8,70 BU
Espuma	210 Nibem
Oxigênio total	90 ppb
Turbidez	0,50 EBC

3.2 Definição dos atributos sensoriais para estudo

Tomando como base a revisão bibliográfica de atributos sensoriais para oxidação / envelhecimento de cervejas, foram eleitos os trabalhos com melhor fundamentação estatística e os atributos mais citados como definidores desse envelhecimento. A escolha desses atributos também levou em conta a experiência prática deste autor com análise sensorial na indústria cervejeira. Raros são os provadores realmente treinados com validação estatística, confiando-se na formação acadêmica de mestre cervejeiro para a produção de resultados sensoriais. Muitos dos trabalhos mencionados na revisão bibliográfica mencionam que os resultados sensoriais foram gerados pela equipe de provadores treinados, que são, na maioria da vezes, os cervejeiros da empresa que patrocinou o trabalho de investigação. Portanto, por serem os mais citados e por representarem grupos de atributos, ficaram definidos os seguintes atributos para o presente estudo:

- 1) sabor e aroma a papelão (que por vezes se combina com os atributos pão, cracker, papel, casca de pão velho)
- 2) sabor metálico
- 3) sabor e aroma a caramelo (que também representa as descrições de adocicado, toffee, couro, groselha)

3.3 Formação da Equipe de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ)

3.3.1 Pré-seleção da equipe

A seleção de provadores foi feita entre o público da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp. Os candidatos à participação na equipe de provadores foram primeiramente entrevistados através do preenchimento de um questionário (Anexo 7-1) que permitiu selecionar provadores que:

- tivessem idade acima de 21 anos;
- tivessem disponibilidade de tempo para os testes;
- não possuíssem problemas de saúde que impedissem sua participação;
- fossem capazes de se expressar através do uso de escalas

Vinte e oito candidatos preencheram os requisitos do questionário e foram pré-selecionados com relação à sua capacidade de discriminação entre cervejas através de análise seqüencial de Wald (Meilgaard et al., 1999), utilizando testes triangulares de diferença entre duas amostras de cerveja, uma tipo Pilsen light e outra tipo Pilsen extra, com diferença significativa ao nível de 0,1%. A diferença entre estas duas amostras foi estabelecida pela realização de um teste pareado com 30 candidatos, onde foram apresentadas as duas amostras, e comprovada a diferença significativa ($p < 0,01$).

Na análise seqüencial foram utilizados os valores para $p=0,45$ (máxima inabilidade aceitável), $p_1=0,70$ (mínima habilidade aceitável), e para os riscos $\alpha=0,20$ (probabilidade de aceitar um candidato sem acuidade sensorial) e $\beta=0,05$ (probabilidade de rejeitar um candidato com acuidade sensorial) (Figura 3-1).

Para os testes triangulares as amostras foram servidas em copos plásticos de 50 ml codificados com números de três dígitos, em cabines individuais iluminadas apenas com luz vermelha para mascarar a diferença de cor entre as amostras. Juntamente com as amostras foi oferecido biscoito tipo cream cracker e um copo de água mineral. Foram selecionados 17 provadores com base em sua capacidade de

distinção entre as duas amostras, para treinamento nos atributos sensoriais de oxidação de cerveja.

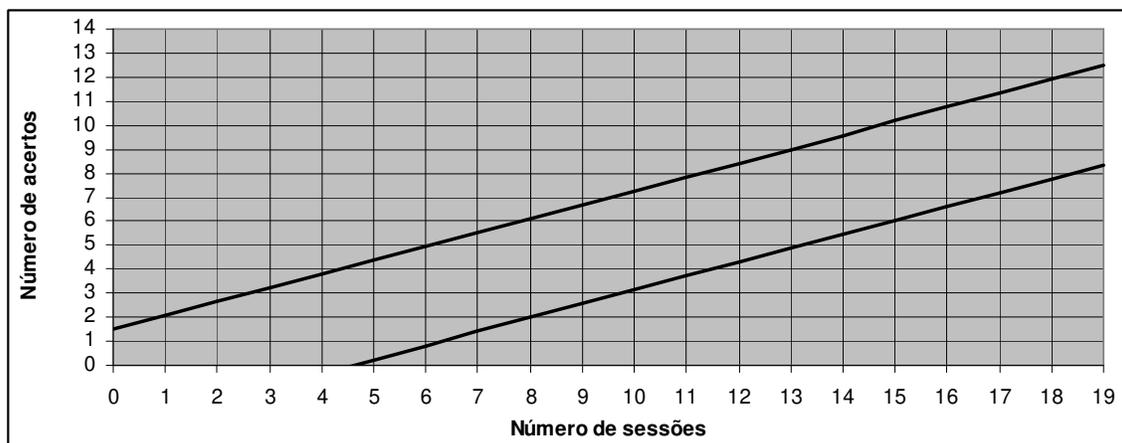


Figura 3-1. Gráfico seqüencial de Wald utilizado para a seleção de provadores com capacidade de distinguir entre as amostras de cerveja tipo Pilsen extra e Pilsen light, utilizando testes triangulares.

3.3.2 Treinamento e seleção da equipe

Os dezessete provadores selecionados passaram então para a definição dos extremos de escala para os três atributos sensoriais pré-determinados: papelão, caramelo e metálico. Cervejas adquiridas no mercado foram preparadas para servirem como exemplos de atributos de oxidação para os provadores. Foram adquiridas amostras com tempo de vida de prateleira avançado (cerca de 5 meses) e cervejas específicas conhecidas por sua característica de sabor oxidado. Além disso, algumas amostras tiveram sua oxidação forçada por aquecimento em estufa por 5 dias a 50°C. Essas amostras foram apresentadas aos provadores em canecos de degustação de cerveja contendo cerca de 50 ml da cerveja referência (Figura 3-2), para que possuíssem parâmetros de definição dos extremos de escala e validassem as amostras de referência a serem usadas no treinamento da equipe (Tabela 3-2). Como ponto inicial de preparação das referências se utilizaram as quantidades descritas por Meilgaard et al. (1982), sobre as quais se adaptaram as referências de acordo com a opinião consensual da equipe de provadores. Os provadores foram instruídos a avaliar o aroma das amostras após leve agitação dos copos para

volatilização dos compostos e, em seguida, ingerir pequena quantidade do líquido para avaliação do sabor.



Figura 3-2. Exemplo de referência utilizadas para treinamento da equipe nos extremos de escala de cada um dos atributos.

Tabela 3-2. Modo de preparo das referências utilizadas para treinamento da equipe nos extremos de escala de cada um dos atributos.

Atributo	Intensidade	Preparo da Referência
Caramelo	Fraco	Cerveja fresca 100 mL
	Forte	100 mL cerveja fresca + 3,0 g extrato de malte CB30/65 marca Pure Malt. Homogeneizar.
Metálico	Nenhum	Cerveja fresca 100 mL
	Forte	50 mL cerveja fresca + 0,0025 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99,5% - Fluka #44970). Homogeneizar.
Papelão	Nenhum	Cerveja fresca 100 mL
	Forte	Equivalente a 0,003 mg trans-2 nonenal / L de cerveja. Preparo: 50 mL cerveja fresca + 0,1 mL da sol. Base. Homogeneizar e manter o copo coberto com vidro de relógio. Preparo da Sol. Base: 0,00003 mL T-2-nonenal (97% - Sigma-Aldrich #255653) + 20 mL etanol 50%

Uma vez definidos os extremos de escala, foi elaborada a ficha de avaliação dos três atributos (Figura 3-3), com escalas não estruturadas de 9 centímetros, ancoradas nos pontos extremos, à esquerda pelo termo “nenhum” e à direita “forte”.

Os provadores puderam treinar pelo tempo desejado com as referências preparadas de acordo com o estabelecido.

Em seguida foram realizados os testes para a seleção da equipe definitiva para a análise descritiva quantitativa, já utilizando a ficha elaborada com as escalas de intensidade. Os provadores foram selecionados com base no poder de discriminação entre amostras (p de $F_{amostra}$), repetibilidade (p de $F_{repetição}$) e concordância entre os provadores, através de análise de variância de dois fatores (amostra e repetição) para cada provador em relação à cada atributo. Onze provadores apresentaram valores de $F_{amostra}$ significativo ($p < 0,30$) e $F_{repetição}$ não significativo ($p > 0,05$) e foram definitivamente selecionados.

Nome: _____	Data: __/__/__	Amostra: _____
Favor indicar nas escalas abaixo, a intensidade percebida para cada um dos atributos.		
CARAMELO	-----	
	Nenhum	Forte
PAPELÃO	-----	
	Nenhum	Forte
METÁLICO	-----	
	Nenhum	Forte

Figura 3-3. Ficha de avaliação quantitativa dos atributos

3.3.3 Análise estatística dos resultados

Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando-se a planilha de cálculos Excel. Com este programa foram geradas todas as análises de variância e também os gráficos necessários para análise de consenso.

3.4 Construção do modelo de aceitação

O objetivo do teste foi avaliar a aceitação de trinta consumidores com relação a cervejas contendo diferentes intensidades dos três atributos representativos da oxidação: papelão, metálico e caramelo. As amostras de cerveja a serem avaliadas sensorialmente deveriam representar todas as combinações possíveis desses três atributos, dentro dos limites máximos e mínimos estabelecidos pela equipe de ADQ. Para cobrir todas essas combinações, um experimento completo 3^2 , com três repetições no ponto central, foi desenhado com os fatores e níveis mostrados na Tabela 3-3; o planejamento completo pode ser visto na Tabela 3-4, sendo $\alpha = (2^n)^{1/4} = (2^3)^{1/4} = 1,68$.

Tabela 3-3. Fatores e níveis do experimento completo para o teste de aceitação.

Nível	Metálico (ppm Fe++)	Papelão (ppm de trans-2-nonenal)	Caramelo (g extrato CB30/65 em 50 ml cerveja)
- 1,68	0	0	0
-1	2,1	0,0006	0,607
0	5,0	0,0015	1,500
+1	8,0	0,0024	2,393
+ 1,68	10,1	0,0030	3,000

A variável resposta do experimento foi a média aritmética dos resultados de aceitação de trinta provadores, que foram escolhidos com os requisitos de que fossem consumidores de cerveja e de que tivessem disponibilidade para realização de cerca de 4 sessões de testes de aceitação. Cada um dos trinta provadores avaliou todas as 17 amostras, apresentadas em “canecos para degustação de cerveja” (denominação dada pelo fabricante dos copos), como os ilustrados na Figura 3-4.

Os canecos foram pintados externamente na cor preto utilizando tinta plástica, para que a coloração da cerveja não influenciasse na avaliação. Nenhum aroma da tinta plástica estava presente nos canecos quando da realização dos testes. Também para mascarar a coloração da cerveja, as amostras foram apresentadas em cabines individuais iluminadas com luz vermelha (Figura 3-5). A seqüência de apresentação monádica das amostras obedeceu ao balanceamento apresentado na Tabela 3-5, onde se observa que todas as amostras foram provadas uma vez por cada provador, sendo servidas no mínimo uma vez e no máximo duas vezes em cada uma das 17 posições. As amostras foram codificadas com códigos aleatórios de três dígitos. Água mineral e bolacha tipo “Cream

Craker” eram disponibilizados aos provadores para consumo antes e entre as amostras, para minimizar a interferência de sabor de uma amostra para outra. Em cada sessão os provadores avaliavam até 5 amostras, dependendo de sua disponibilidade de tempo no momento, para realização dos testes. Provadores que desejassem realizar mais de uma sessão num mesmo dia, eram orientados a respeitar um intervalo mínimo de uma hora entre cada sessão.

Tabela 3-4. Planejamento do experimento completo 2^3 com 3 repetições no ponto central, para avaliação estatística do teste de aceitação.

Ensaio	Níveis dos fatores			Amostras
	Metálico	Papelão	Caramelo	
1	-1	-1	-1	A
2	+1	-1	-1	B
3	-1	+1	-1	C
4	+1	+1	-1	D
5	-1	-1	+1	E
6	+1	-1	+1	F
7	-1	+1	+1	G
8	+1	+1	+1	H
9	-1,68	0	0	I
10	+1,68	0	0	J
11	0	-1,68	0	L
12	0	+1,68	0	M
13	0	0	-1,68	N
14	0	0	+1,68	O
15	0	0	0	P
16	0	0	0	Q
17	0	0	0	R

Os consumidores avaliaram as cervejas e indicaram seu grau de aceitação com relação a cada uma das 17 amostras, utilizando uma ficha contendo escala estruturada de 9 pontos (1= desgostei muitíssimo; 2= desgostei muito; 3= desgostei moderadamente; 4= desgostei ligeiramente; 5= nem gostei / nem desgostei; 6= gostei ligeiramente; 7= gostei moderadamente; 8= gostei muito; 9= gostei muitíssimo) (Figura 3-6).



Figura 3-4. “Canecos de degustação de cerveja” pintados de preto. Utilizados para o teste de aceitação.

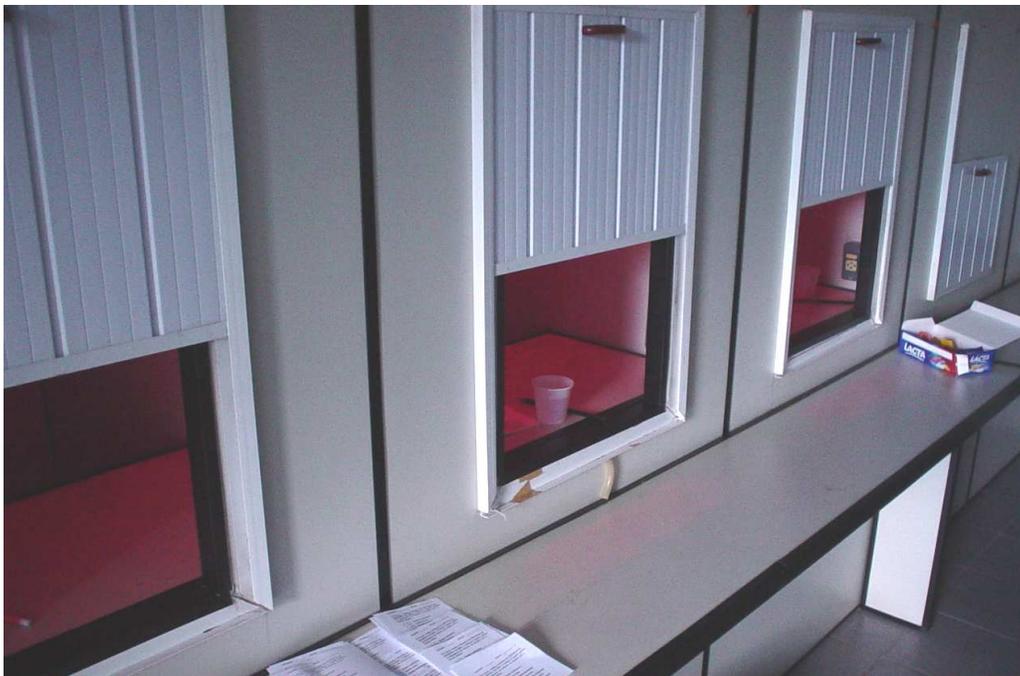


Figura 3-5. Cabines individuais iluminadas com luz vermelha, para avaliação das amostras pelos provadores do teste de aceitação.

Amostra : _____ Nome: _____

Por favor, avalie a amostra de CERVEJA de MANEIRA GLOBAL e indique o quanto gostou ou desgostou da mesma, de acordo com a escala abaixo:

9 Gostei muitíssimo
8 Gostei muito
7 Gostei moderadamente
6 Gostei ligeiramente
5 Nem gostei , nem desgostei
4 Desgostei ligeiramente
3 Desgostei moderadamente
2 Desgostei muito
1 Desgostei muitíssimo

Figura 3-6. Ficha de avaliação utilizada para os testes de aceitação

Todos os provadores convidados a participar dos testes faziam parte do público da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, sendo alunos, funcionários, pesquisadores ou visitantes, com idade entre 21 e 48 anos. A Figura 3-7 resume graficamente o perfil dos provadores participantes do teste.

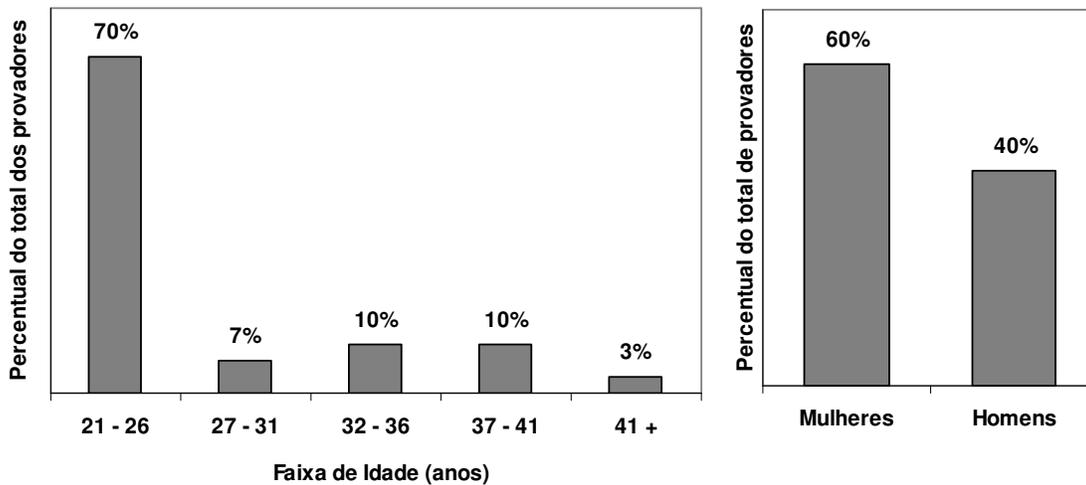


Figura 3-7. Perfil de idade e sexo dos trinta provadores participantes do teste de aceitação para construção do modelo matemático.

Tabela 3-5. Balanceamento da seqüência de apresentação das amostras do teste de aceitação, com a codificação de 3 dígitos utilizada. Cada amostra foi provada uma vez por cada um dos 30 provadores, no mínimo 1 e no máximo 2 vezes em cada uma das 17 posições sequenciais.

Prov	1			2			3			4			5			6	
1	A	J	C	F	I	P	O	E	Q	R	D	N	H	G	L	M	B
	359	193	336	534	918	325	428	179	648	471	442	948	595	997	377	839	629
2	J	A	F	P	C	O	M	N	E	D	Q	H	R	L	G	B	I
	848	449	386	194	604	379	831	504	924	738	637	431	525	967	521	489	455
3	H	E	A	R	O	C	N	I	D	Q	P	L	J	M	B	G	F
	551	499	251	591	602	257	547	781	740	429	548	959	224	546	781	480	902
4	F	H	J	A	L	N	D	R	I	C	E	O	B	M	P	Q	G
	651	341	864	214	710	565	362	798	841	279	160	392	785	436	208	689	571
5	G	N	H	J	Q	D	L	F	C	I	M	E	B	P	O	R	A
	912	550	794	499	391	248	655	401	168	796	227	779	515	860	125	163	829
6	L	G	M	H	D	A	R	P	J	C	I	B	E	N	Q	O	F
	952	895	507	336	991	722	251	189	404	429	476	819	536	462	491	211	867
7	C	L	G	D	H	J	A	M	N	P	B	I	Q	E	R	F	O
	411	192	379	208	532	151	120	554	758	876	799	450	937	885	391	685	618
8	N	C	D	G	F	H	M	A	Q	B	J	P	I	R	E	O	L
	277	349	301	578	310	136	732	171	978	425	374	464	426	136	917	829	190
9	D	N	B	J	G	L	H	R	A	Q	O	C	M	I	F	E	P
	321	435	766	358	589	650	855	624	820	490	780	743	878	738	847	368	272
10	H	D	R	M	J	G	F	B	O	A	Q	N	C	L	I	P	E
	936	232	321	226	168	528	906	308	512	941	980	449	852	747	926	450	243
11	D	P	E	N	O	Q	B	J	G	H	A	M	F	C	L	I	R
	930	513	434	869	277	679	685	234	102	391	807	264	418	785	686	175	348
12	Q	M	D	O	N	B	G	L	I	H	P	A	F	J	C	R	E
	324	118	685	413	188	158	454	345	981	281	326	894	764	921	507	191	994
13	M	P	O	D	B	N	I	H	L	J	G	F	R	A	E	C	Q
	561	718	628	163	376	159	740	389	416	289	596	426	869	443	690	718	405
14	I	O	M	B	D	E	C	Q	G	J	F	H	N	A	P	L	R
	605	930	426	177	917	820	470	241	921	523	570	298	984	341	942	989	576
15	G	Q	B	O	M	D	E	N	P	F	L	J	H	R	A	I	C
	610	689	291	638	940	463	541	773	409	154	401	299	693	837	744	162	824
16	O	B	N	Q	E	M	P	D	F	L	G	R	C	H	I	A	J
	574	817	699	708	370	323	653	335	787	157	621	589	513	327	205	739	524
17	B	H	O	N	P	R	E	D	F	M	C	G	L	I	Q	J	A
	371	228	420	479	414	240	855	541	907	621	524	137	619	549	144	506	313
18	A	R	Q	P	L	I	O	F	D	N	M	C	G	E	J	H	B
	475	311	748	175	345	595	685	364	814	141	297	366	541	565	945	629	120
19	P	A	L	H	R	G	F	O	C	D	E	J	I	Q	N	B	M
	860	308	812	944	421	597	142	750	758	214	494	389	135	155	895	738	200
20	L	G	A	R	H	F	J	C	O	E	D	I	M	P	B	N	Q
	113	805	882	685	117	524	931	448	877	775	287	185	790	558	893	724	418
21	R	L	J	A	F	H	C	P	E	O	I	D	Q	B	M	G	N
	366	639	204	884	353	803	816	842	448	422	770	273	344	247	590	406	560
22	N	J	L	F	A	C	H	E	B	I	R	Q	D	O	G	M	P
	466	520	327	499	558	981	446	516	738	755	847	260	208	713	760	717	147
23	J	I	F	L	C	A	Q	H	R	P	N	B	O	D	M	E	G
	735	510	753	660	840	903	223	713	842	946	268	315	302	383	110	679	994
24	R	F	Q	C	J	E	A	I	H	O	B	L	N	G	D	P	M
	524	393	354	520	565	659	619	126	940	239	358	278	442	685	613	281	417
25	F	R	C	Q	E	L	I	A	M	B	J	P	G	O	H	D	N
	513	147	864	399	760	625	770	117	847	391	428	925	195	937	968	102	943
26	Q	C	R	B	P	I	L	M	A	G	H	E	J	F	O	N	D
	870	411	279	232	975	337	196	537	836	128	163	137	998	941	529	324	934
27	C	F	E	I	Q	M	P	G	B	A	O	R	D	N	J	L	H
	269	245	278	394	758	388	691	541	575	250	674	762	495	832	319	147	407
28	P	E	G	I	M	R	B	Q	H	N	A	F	L	D	C	J	O
	434	716	990	679	804	740	265	505	737	991	721	246	281	522	795	476	215
29	E	M	I	G	R	B	Q	O	N	L	F	A	P	H	D	C	J
	758	754	311	335	483	933	241	768	302	319	566	505	261	678	511	662	294
30	M	I	P	E	B	O	N	G	R	F	L	Q	A	J	H	D	C
	606	130	456	353	963	658	462	367	998	618	214	906	233	864	474	698	933

3.4.1 Preparação das amostras

A cerveja base para o teste de aceitação foi adquirida no mercado local da cidade de Campinas-SP, com o pré-requisito de que fosse o mais jovem possível, levando-se em conta que a data de validade marcada na garrafa é 180 dias maior que data de envasamento. A cerveja comprada tinha 20 dias de idade e foi mantida em câmara fria a 5°C durante todo o período até o teste de aceitação, sendo retirada apenas um dia antes de ser servida aos provadores, e colocada em geladeira para manter temperatura de 8°C. Nessa temperatura também era servida aos provadores para avaliação da aceitação.

Para obtenção dos níveis do atributo papelão, foram preparadas quatro soluções alcoólicas padrão de *trans*-2-nonenal (Tabela 3-6), de modo que a adição de 0,100 ml da solução alcoólica padrão a 50 ml de da cerveja base, resultasse na concentração final desejada de *trans*-2-nonenal na amostra. A quantidade de etanol em 0,100 ml de solução padrão não é representativa se comparada à quantidade de etanol originalmente presente nos 50 ml de cerveja base da amostra. A seqüência de preparo das soluções foi a seguinte: 0,15 µl *trans*-2-nonenal (97% - Sigma-Aldrich #255653) foram adicionados a 100 ml de etanol 50%; parte dessa solução (considerada aqui para termos didáticos como 100%) foi utilizada como padrão para o nível +1,68 do experimento; diluições com etanol 50% foram feitas para obter soluções 80% (nível +1), 50% (nível 0) e 20% (nível -1).

Tabela 3-6. Soluções padrão de *trans*-2-nonenal para obtenção dos níveis do atributo papelão nos testes de aceitação.

Nível	Concentração de <i>trans</i> -2-nonenal na solução alcoólica padrão	Quantidade de <i>trans</i> -2-nonenal em 0,1 ml adicionado aos 50 ml de cerveja	Concentração de <i>trans</i> -2-nonenal na cerveja (µg/l)
-1,68	0	0	0
-1	0,030 µl em 100 ml	0,000030 µl = 0,030 µg	0,6
0	0,075 µl em 100 ml	0,000075 µl = 0,075 µg	1,5
+1	0,120 µl em 100 ml	0,00012 µl = 0,12 µg	2,4
+1,68	0,150 µl em 100 ml	0,00015 µl = 0,15 µg	3,0

Para obtenção dos níveis do atributo metálico, foram preparadas quatro soluções padrão de FeSO₄ · 7 H₂O (99,5% - Fluka #44970) (Tabela 3-7) através da diluição do sal em água destilada, de modo que a adição de 0,100 ml da solução padrão a 50 ml de da cerveja base, resultasse na concentração final desejada de sulfato ferroso na amostra.

Tabela 3-7. Soluções padrão de sulfato ferroso para obtenção dos níveis do atributo metálico nos testes de aceitação.

Nível	Quantidade de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ e volume preparado de solução	Quantidade de $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ em 0,1 ml adicionado aos 50 ml de cerveja	Concentração de íons Fe^{++} na cerveja (ppm)
-1,68	0	0	0
-1	0,0765 g em 15 ml H_2O	0,00051 g	2,1
0	0,375 g em 30 ml H_2O	0,00125 g	5,0
+1	0,2985 g em 15 ml H_2O	0,00199 g	8,0
+1,68	0,1000 g em 4 ml H_2O	0,00250 g	10,1

Para obtenção dos níveis do atributo caramelo, quantidades definidas de extrato de malte (PureMalt CB30/65) foram adicionadas a 50 ml de cerveja base, segundo mostra a Tabela 3-8.

Tabela 3-8. Quantidade de extrato de malte caramelo utilizadas para obtenção dos níveis do atributo caramelo nos testes de aceitação.

Nível	Massa de extrato de malte em 50 ml cerveja
- 1,68	0
-1	0,607 g
0	1,500 g
+1	2,393 g
+ 1,68	3,000 g

A seqüência de preparação era exatamente a mesma para todas as amostras, independente do nível de cada um dos atributos. As quantidades de extrato de malte para cada nível desejado de caramelo eram pesadas previamente em béqueres de vidro de 50 ml (Figura 3-8). No momento de servir a amostra ao provador, 50 ml de cerveja eram adicionados ao béquer com extrato de malte e homogeneizados utilizando-se um bastão de vidro. Em seguida, as soluções padrão de caramelo e papelão relativas ao nível desejado do experimento, eram adicionadas ao béquer com cerveja utilizando-se um pipetador automático de 0,1 ml (Figura 3-9), e novamente homogeneizadas. Todo o conteúdo do béquer era então transferido ao caneco de degustação codificado e servido ao provador para avaliação.



Figura 3-8. Béqueres de 50 ml contendo quantidades pesadas de extrato de malte para preparação das amostras do teste de aceitação. A figura mostra também a bolsa contendo o extrato de malte utilizado.



Figura 3-9. Soluções padrão de *trans*-2-nonenal e sulfato ferroso utilizadas para preparação das amostras do teste de aceitação.

3.4.2 Análise estatística dos resultados

As notas individuais dos trinta provadores foram tabuladas para cálculo da média das notas de aceitação para cada uma das 17 amostras. Um gráfico dessas médias permitiu uma análise preliminar dos resultados. Mais que isso, como as 17 amostras

representavam os 17 ensaios de um experimento completo com 3 fatores mais 3 repetições no ponto central, os resultados permitiram uma modelagem dos resultados, utilizando análise de variância (ANOVA) para construção de gráficos de superfície de resposta. Foram considerados significativos para construção do modelo, os parâmetros com $p < 0,10$. Para essa modelagem foi utilizado o software Statistica versão 5.0.

3.5 Envelhecimento forçado

Foram envelhecidas amostras da cerveja fresca para avaliação dos efeitos da temperatura de estocagem, da vibração no transporte e da incidência de luz, sobre a estabilidade sensorial. O envelhecimento das amostras e sua análise sensorial também permitiram a validação do modelo de aceitação proposto. As cervejas utilizadas para o envelhecimento forçado foram obtidas no mercado, com o mesmo critério das amostras obtidas para os testes sensoriais descritivos e afetivos, citados anteriormente. Após a compra, todas as garrafas foram mantidas em câmara fria a 5°C até o momento de sua utilização para o envelhecimento ou para as análises. Após os procedimentos de envelhecimento forçado, as amostras foram mantidas na câmara fria até o momento da análise.

Um experimento fatorial completo foi planejado para avaliação do efeito de cada um dos fatores (variáveis independentes) sobre a estabilidade sensorial. Com esse planejamento foi possível quantificar qual dos três fatores ou suas interações é mais significativo sobre a estabilidade. A Tabela 3-9 e a Tabela 3-10 trazem o detalhamento do experimento 2^3 completo. No experimento, as amostras foram expostas durante três dias aos fatores de envelhecimento. A escolha do período de três dias visou simular situações de transporte que sejam representativas das realidades extremas brasileiras, onde cervejarias enviam sua cerveja por via rodoviária para atravessar todo o país. Foi considerado o período de seis dias em transporte como uma condição extrema, sendo que 50% desse tempo se refere ao período noturno, com menor incidência dos fatores de envelhecimento. As variáveis resposta do experimento foram: teor de trans-2-nonenal, avaliação sensorial pela equipe de provadores treinados de uma grande cervejaria nacional, avaliação pela equipe de ADQ de cerveja formada na Unicamp e aceitação dos consumidores.

Tabela 3-9. Condições do experimento fatorial completo de envelhecimento forçado de cerveja tipo Pilsen. As condições foram mantidas por 72 horas para todos os ensaios.

Nível	Temperatura	Agitação	Luz
- 1	25°C	0 rpm	0 lux
+ 1	50°C	120 rpm	7500 lux

Tabela 3-10. Planejamento do Experimento completo 2³ para quantificação dos efeitos dos fatores Temperatura, Agitação e Incidência de luz sobre a estabilidade sensorial da cerveja.

Ensaio	Temperatura	Agitação	Luz
1	- 1	- 1	- 1
2	+ 1	- 1	- 1
3	- 1	+ 1	- 1
4	+ 1	+ 1	- 1
5	- 1	- 1	+ 1
6	+ 1	- 1	+ 1
7	- 1	+ 1	+ 1
8	+ 1	+ 1	+ 1

Para exposição à temperatura de estocagem, garrafas de 600 ml da cerveja fresca foram mantidas em estufa com circulação de ar a 50°C (Marca Tecnal modelo TE-394-2). Para exposição à luz e temperatura (ensaio 6), foram instaladas lâmpadas fluorescentes (Philips Genie 14W / Temperatura de Cor = 6500 K / Fluxo luminoso = 760 lm) na mesma estufa (Figura 3-10). A iluminância foi verificada com um luxímetro (Lutron LX-102) e variou entre 6600 e 8800 lux, dependendo da posição de cada garrafa em relação às lâmpadas. Para garantir que as amostras recebessem a mesma quantidade total de luminosidade, as garrafas foram trocadas de posição a cada 24 horas. A intensidade de incidência de luz escolhida buscou valores intermediários entre um dia encoberto de verão (20.000 lux) e um dia escuro de inverno (3.000 lux) (Luz, 2006).

Para exposição à vibração no transporte, as garrafas foram agitadas a 120 rpm em “shaker” de laboratório (Marconi MA 830) dotado de sistema de controle de temperatura, o que permitiu também o aquecimento a 50°C dos ensaios 4 e 8 (Tabela 3-10). Ao equipamento também foram adaptadas as lâmpadas fluorescente para realizar os ensaios 7 e 8, onde se garantiu a mesma luminosidade média da estufa nas diferentes posições das garrafas, que eram trocadas de posição a cada 24 horas de envelhecimento forçado (Figura 3-11).



Figura 3-10. Garrafas de cerveja em estufa para envelhecimento forçado por ação de temperatura elevada e incidência de luz.



Figura 3-11. Garrafas de cerveja em "shaker" para envelhecimento forçado por ação de agitação, temperatura elevada e/ou incidência de luz.

3.5.1 Teste de aceitação

As cervejas submetidas ao tratamento forçado de envelhecimento foram avaliadas quanto à sua aceitação por 27 provadores escolhidos aleatoriamente do público da Faculdade de Engenharia de Alimentos. As amostras foram apresentadas em cabines individuais do Departamento de Tecnologia de Alimentos da Unicamp. A seqüência de

apresentação monádica das amostras obedeceu ao balanceamento apresentado na Tabela 3-11, onde se observa que todas as amostras foram provadas uma vez por cada provador, sendo servidas no mínimo três e no máximo quatro vezes em cada uma das 8 posições. As amostras foram codificadas com códigos aleatórios de três dígitos. Cinquenta mililitros de amostra, à temperatura entre 5 e 7°C, eram servidos em copos plásticos de 50 ml. Água mineral era disponibilizada aos provadores para consumo antes e entre as amostras, para minimizar a interferência de sabor de uma amostra para outra. Os provadores avaliaram as amostras em duas sessões de quatro amostras cada uma. Provadores que desejassem realizar mais de uma sessão num mesmo dia, eram orientados a respeitar um intervalo mínimo de uma hora entre cada sessão.

O perfil dos 29 provadores participantes no teste de aceitação está representado graficamente na Figura 3-12.

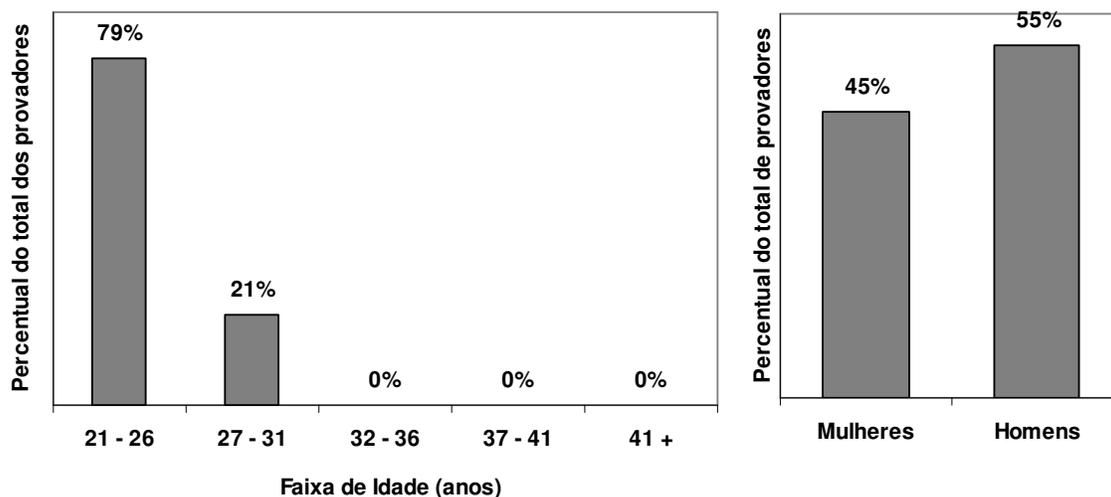


Figura 3-12. Perfil de idade e sexo dos provadores do teste de aceitação das amostras envelhecidas por ação da temperatura, luz e agitação.

Tabela 3-11. Balanceamento da seqüência de apresentação das amostras para o teste de aceitação por 30 provadores. Cada amostra é provada uma vez por cada provador, no mínimo 3 e no máximo 4 vezes em cada uma das 8 posições seqüenciais.

	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Prov1	A	B	C	D	E	F	G	H
Prov2	F	H	E	D	C	G	B	A
Prov3	B	D	A	G	H	C	E	F
Prov4	E	F	D	A	H	B	C	G
Prov5	D	B	H	E	A	G	F	C
Prov6	B	E	G	H	F	A	D	C
Prov7	G	F	H	B	C	E	A	D
Prov8	C	G	B	E	D	H	F	A
Prov9	E	B	D	A	G	H	C	F
Prov10	E	G	F	C	B	A	D	H
Prov11	F	A	C	G	D	H	E	B
Prov12	H	G	A	B	F	C	E	D
Prov13	G	F	H	E	A	C	B	D
Prov14	C	D	G	B	A	H	F	E
Prov15	B	G	D	E	C	A	H	F
Prov16	H	C	B	F	D	G	A	E
Prov17	C	H	F	D	G	B	E	A
Prov18	E	A	G	H	F	D	C	B
Prov19	A	D	C	F	E	G	B	H
Prov20	G	A	H	C	B	F	D	E
Prov21	D	F	A	G	E	B	H	C
Prov22	F	C	B	A	G	E	H	D
Prov23	H	E	D	C	A	F	G	B
Prov24	H	D	C	F	G	A	B	E
Prov25	D	H	F	G	B	E	A	C
Prov26	G	H	B	C	E	D	F	A
Prov27	A	B	E	D	F	C	H	G
Prov28	A	C	G	B	H	E	D	F
Prov29	D	A	E	H	C	F	G	B
Prov30	B	E	A	F	H	D	C	G

3.5.2 Análise sensorial descritiva na cervejaria

As amostras de cervejas envelhecidas foram avaliadas por 5 provadores da equipe treinada de uma cervejaria nacional de grande porte. Como rotina, esse cinco provadores avaliam a cerveja em testes sensoriais descritivos, para controle do processo de produção das fábricas, para comparação do produto próprio com produtos concorrentes e para desenvolvimento de novos produtos. Foram treinados em escala de 0 a 10 pontos para os atributos papelão, metálico e caramelo. Os extremos de escala utilizados para treinamento dos provadores são exatamente os mesmo utilizados para elaboração dos experimentos de modelagem neste trabalho. As condições da análise

sensorial na cervejaria não foram controladas por este autor, apenas foram monitoradas, visando interferir o menos possível em procedimentos em uso na indústria. Isso permite estender os resultados práticos deste trabalho a condições práticas das cervejarias.

Para avaliação, foram apresentadas fichas onde o provador tinha instruções para avaliar cada uma das amostras separadamente, quantificando os três atributos listados, conforme escala de 10 pontos, representada por uma reta de 10cm, onde 0=(ausência) e 10=(muito forte). A reta apresentava pequenas indicações a cada cm para ajudá-los a se orientar. As amostras foram apresentadas monadicamente e na mesma ordem para todos os provadores.

3.5.3 Análises químicas

Além da análise sensorial das cervejas submetidas ao envelhecimento forçado, foram também usados como indicadores do grau de oxidação, os teores de trans-2-nonenal (T2N) e a cor do produto. O T2N foi usado como indicador por ser o composto mais amplamente citado nos trabalhos publicados sobre o envelhecimento da cerveja. A análise de cor foi feita por também ser citada como indicador do envelhecimento, e pela simplicidade e rapidez de sua realização, de acordo com metodologia descrita pela AOAC (1997).

3.5.3.1 Determinação do teor de trans-2-nonenal

Na determinação do trans-2-nonenal por CG-MS foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimadzu 17A acoplado ao espectrofotômetro de massas QP5000. A extração foi realizada em fibra mixta (Carboxen/PDMS - 75µm com Holder manual) pelo método de headspace com micro-extração em fase sólida (HS-SPME) nas seguintes condições (Vesely et al., 2003):

- Quantidade de amostra: 10 mL em frasco de 23 mL
- Temperatura de extração: 50 °C
- Tempo de equilíbrio (antes de expor a fibra): 15 min
- Tempo de extração (fibra exposta ao headspace): 90 min
- Uso de agitação: sim

Antes da extração em fibra, foi homogeneizado o conteúdo de duas garrafas de amostra, seguido por 10 segundos em ultrassom para remoção parcial do gás carbônico.

Condições cromatográficas utilizadas:

- Temperatura no injetor: 280 °C
- Temperatura no Detector de massas: 240 °C (fonte de ionização de 70 eV)
- Programação da coluna:
 - 60 °C rampa de aquecimento de 3 °C/min até 100 °C
 - Rampa de 10 °C/min até 200 °C
 - Permanência a 200°C por 7 min para redução do tempo da corrida
- Gás de arraste: vazão constante de 1,0 mL/min de gás Hélio
- Íons monitorados para a quantificação (m/z): 55, 70, 83, 96, 111 e 122
- Tempo de desorção da fibra no injetor: 10 min.
- Período de *Splitless*: 2 min.

A quantificação foi realizada através de curva de calibração externa construída utilizando um sistema modelo (solução de etanol a 5%, em pH 4,5 ajustado com ácido o-fosfórico) conforme descrito por Vesely et al. (2003). As concentrações utilizadas para a construção da curva padrão foram de 0,2, 2, 20 e 60 µg/l (ppb) resultando num coeficiente de linearidade de $R^2 = 0,9994$. Para os parâmetros de precisão (repetibilidade) e exatidão (recuperação), foram realizadas oito corridas consecutivas com adição de 2 ppb de trans-2-nonenal em amostra comercial de cerveja, resultando em um coeficiente de variação (CV) de 4,04% e um índice de recuperação de 96,7%. O Anexo 7-3 traz o detalhamento estatístico e os cálculos das determinações cromatográficas de T2N.

4 Resultados e discussão

4.1 Teste de aceitação para modelagem

4.1.1 Análise estatística convencional

As notas individuais de aceitação de cada provador para cada uma das amostras constam do Anexo 7-2 e o resumo estatístico dos resultados pode ser visto no gráfico de barras da Figura 4-1. A Tabela 4-1 traz a análise de variância dos resultados do teste de aceitação.

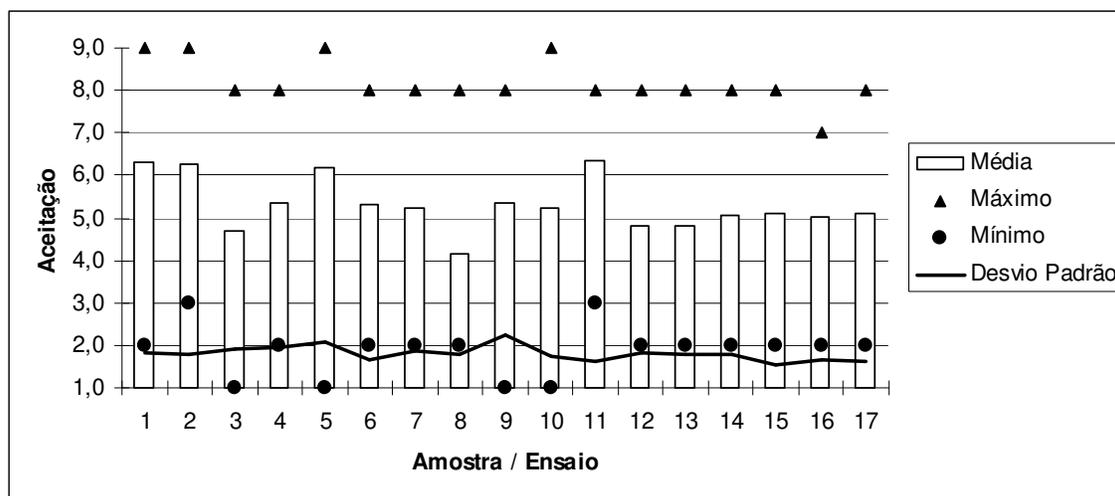


Figura 4-1. Gráfico com o resumo estatístico das notas de aceitação dos 30 provadores.

Tabela 4-1. Análise de variância dos resultados do teste de aceitação.

<i>FV</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>SQM</i>	<i>F</i>	<i>P-value</i>	<i>F crit (P<0,05)</i>
Amostra	184,9	16	11,55	4,300	6,54E-08	1,665
Provador	430,2	29	14,83	5,520	9,74E-17	1,492
Erro	1.246,8	464	2,69			
Total	1.861,8	509				

De acordo com os resultados da ANOVA, conclui-se que existe diferença de aceitação entre as 17 amostras ao nível de 5% de significância. Comparando as médias

das notas de aceitação para cada amostra utilizando o teste de Tukey, verifica-se quais os grupos de amostras possuem diferença significativa de aceitação entre si, ao nível de 5% de significância (Tabela 4-2). O valor tabelado de mínima diferença significativa (MDS) é:

$$q_{p<0,05; 17, \infty} = 4,89$$

$$MDS = q \sqrt{\frac{SQM_{\text{resíduo}}}{n^{\circ} \text{ julgamentos por amostra}}} = 4,89 \sqrt{\frac{2,69}{30}} = 1,46$$

Tabela 4-2. Médias das notas de aceitação comparadas utilizando o Teste de Tukey. As médias codificadas com letras iguais não diferem entre si a $p<0,05$.

Amostra	Média das notas de aceitação
1	6,30 a
2	6,28 a
3	4,70 a b
4	5,37 a b
5	6,17 a
6	5,30 a b
7	5,23 a b
8	4,13 b
9	5,37 a b
10	5,23 a b
11	6,33 a
12	4,80 a b
13	4,83 a b
14	5,07 a b
15	5,10 a b
16	5,03 a b
17	5,10 a b

A amostra com menor aceitação, a número 8, difere significativamente ($p<0,05$) das amostras 1, 2, 5 e 11, que são as de maior aceitação. Analisando em detalhes as características dessas 5 amostras (Tabela 4-3), verificamos que a presença do atributo papelão foi o que mais influenciou para que a amostra número 8 tivesse baixa aceitação. Apesar dos níveis dos atributos metálico e caramelo também serem elevados na amostra 8, esta ainda diferiu em aceitação de amostras contendo o mesmo nível desses atributos (amostras 2 e 5).

Tabela 4-3. Características das amostras que diferiram entre si no teste de aceitação.

Amostra	Metálico (ppm Fe ⁺⁺)	Papelão (µg/g de <i>trans</i> -2-nonenal)	Caramelo (g extrato CB30/65 em 50 ml cerveja)
1	2,1	0,6	0,607
2	8,0	0,6	0,607
5	2,1	0,6	2,393
11	5,0	0	1,500
8	8,0	2,4	2,393

É importante também notar que outras amostras que tinham como característica os altos níveis do atributo papelão (amostras 3, 4, 7 e 12) não apresentaram diferença significativa de aceitação ao nível de 5% de significância. Ainda, amostras com baixo teor do atributo papelão (1, 2, 5, 6 e 11) não tiveram aceitação significativamente melhor que amostras com maior concentração desse atributo. Isso mostra a existência de interação entre os fatores metálico, papelão e caramelo, o que poderá ser avaliado com a análise estatística mais apurada.

4.1.2 Modelagem matemática dos resultados de aceitação

Os valores das médias das notas de aceitação foram alimentados no programa Statistica v.5.0 para análise do experimento completo 2³, com 3 repetições no ponto central.

Fatores:

- Intensidade do atributo papelão (Papelão)
- Intensidade do atributo caramelo (Caramelo)
- Intensidade do atributo metálico (Metálico)

Variável resposta:

- Média das notas de aceitação de 30 provadores

A primeira Análise dos Coeficientes de Regressão (Tabela 4-4) para obtenção do modelo levou à eliminação dos seguintes termos não significativos estatisticamente ($p > 0,10$):

- Caramelo (Q) / Metálico (L) e (Q)
- Interações: Caramelo x Papelão e Papelão X Metálico

Tabela 4-4. Primeira avaliação dos coeficientes de correlação dos termos para obtenção do modelo. (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático. Coeficiente de ajuste do modelo: $R^2 = 0,9146$

Fator	Coeficiente de Regressão	Valor p
Média	5,068074	0,000000
Caramelo (L)	-0,148954	0,085052
Caramelo (Q)	0,111994	0,213213
Papelão (L)	-0,526384	0,000196
Papelão (Q)	0,206275	0,039691
Metálico (L)	-0,068165	0,389491
Metálico (Q)	-0,011750	0,889816
Interação Caramelo x Papelão	0,051250	0,613908
Interação Caramelo x Metálico	-0,326250	0,012080
Interação Papelão x Metálico	0,057083	0,575039

É bastante interessante o fato dos termos linear e quadrático do fator metálico não serem significativos. A interação dos teores de caramelo e metálico se mostrou, todavia, significativa estatisticamente.

Os coeficientes de correlação foram reavaliados após a remoção dos termos não significativos e podem ser vistos na Tabela 4-5. O coeficiente de correlação linear também apresentou valor satisfatório ($R^2=0,86983$).

Tabela 4-5. Avaliação dos coeficientes de correlação dos termos para obtenção do modelo, após a eliminação dos termos não significativos. (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático. Coeficiente de ajuste do modelo: $R^2 = 0,86983$

Fator	Coeficiente de Regressão	Valor p
Média	5,166969	0,000000
Caramelo (L)	-0,148954	0,054968
Papelão (L)	-0,526384	0,000007
Papelão (Q)	0,183415	0,025155
Interação Caramelo / Metálico	-0,326250	0,003898

Definidos os termos significativos, o modelo matemático com variáveis codificadas é o seguinte:

$$y = 5,166969 - 0,148954 x_1 - 0,526384 x_2 + 0,183415 x_2^2 - 0,326250 x_1 x_3$$

Para verificação da validade deste modelo matemático, foi realizado o teste F. A Tabela 4-6 mostra os dados obtidos com a ANOVA e a Tabela 4-7 traz os dados desta mesma ANOVA com os termos do modelo agrupados de modo a permitir compará-los com a média dos quadrados (SQM ou MS) do resíduo.

Tabela 4-6. Análise de variância dos termos do modelo.

FV	SQ	GL	SQM	F calc	Valor p
Caramelo (Q)	0,303	1	0,303	204,5	0,00485
Papelão (L)	3,784	1	3,784	2554,2	0,00039
Papelão (Q)	0,438	1	0,438	295,9	0,00336
Caramelo x Metálico	0,852	1	0,852	574,8	0,00173
Falta de ajuste	0,802	10	0,0802	54,11	0,01828
Erro puro	0,003	2	0,0015		
Total	6,182	16			

Tabela 4-7. ANOVA com os termos do modelo agrupados para comparação com a média dos quadrados do resíduo ($R^2 = 0,86983$).

FV	SQ	GL	SQM	F calc	F tab ($p=0,05$)
Regressão	5,377	4	1,344	20,06	3,26
Resíduo	0,805	12	0,067		
Falta de ajuste	0,802	10	0,0802	53,47	2,77
Erro puro	0,003	2	0,0015		
Total	6,182	16			

Pelos dados da ANOVA resumida conclui-se que os termos da regressão são significativos a $p < 0,05$ para representar as variações ocorridas nas notas de aceitação (F calculado > F tabelado). A falta de ajuste se mostrou também significativa, porém isso se deveu ao fato de o erro puro do experimento ser muito baixo. Com isso conclui-se pela validade do modelo matemático obtido.

Para verificar os desvios entre os resultados reais obtidos e os resultados gerados pelo modelo, foi montada a Tabela 4-8. Analisando os dados obtidos, percebe-se

o excelente resultado, com desvio máximo de 10% entre os dados reais e os dados calculados pelo modelo.

Tabela 4-8. Comparação entre os dados reais obtidos e os dados gerados pelo modelo matemático.
Modelo: $y = 5,166969 - 0,148954 x_1 - 0,526384 x_2 + 0,183415 x_2^2 - 0,326250 x_1 x_3$.

Ensaio	Caramelo (x_1)	Papelão (x_2)	Metálico (x_3)	Aceitação Real	Aceitação Calculada	Desvio (%)
1	-1	-1	-1	6,30	5,70	-10%
2	-1	-1	+1	6,28	6,35	1%
3	-1	+1	-1	4,70	4,65	-1%
4	-1	+1	+1	5,37	5,30	-1%
5	+1	-1	-1	6,17	6,05	-2%
6	+1	-1	+1	5,30	5,40	2%
7	+1	+1	-1	5,23	5,00	-4%
8	+1	+1	+1	4,13	4,35	5%
9	-1,68	0	0	5,37	5,42	1%
10	+1,68	0	0	5,23	4,92	-6%
11	0	-1,68	0	6,33	6,57	4%
12	0	+1,68	0	4,80	4,80	0%
13	0	0	-1,68	4,83	5,17	7%
14	0	0	+1,68	5,07	5,17	2%
15	0	0	0	5,10	5,17	1%
16	0	0	0	5,03	5,17	3%
17	0	0	0	5,10	5,17	1%

A validação estatística do modelo obtido permite que seja montado o modelo real (decodificado) de modo que seja utilizado, de forma prática, como instrumento de decisão nas cervejarias para a liberação de lotes de produção.

Para tanto, realizou-se novamente a análise estatística dos resultados de aceitação, utilizando-se os níveis em valores entre 0 e 100 (%), ou seja, os valores codificados -1,68, -1, 0, +1 e +1,68 foram decodificados para 0, 20, 50, 80 e 100, respectivamente. Os fatores foram descartados de acordo com a análise dos coeficientes de regressão dos dados codificados (vide acima). A análise de regressão mostrou os dados obtidos na Tabela 4-9.

Tabela 4-9. Coeficientes de regressão obtidos com os dados reais, após a eliminação dos termos não significativos, de acordo com a análise de regressão dos dados codificados. (L) = termo linear; (Q) = termo quadrático. Coeficiente de ajuste do modelo: $R^2 = 0,79521$

Fator	Coeficiente de Regressão	Valor p
Média	6,816086	0,000000
Caramelo (L)	0,000074	0,985454
Papelão (L)	-0,038430	0,003424
Papelão (Q)	0,000208	0,063017
Interação Caramelo / Metálico	-0,000101	0,081872

Com isso, temos o seguinte modelo real:

$$\text{ACEIT} = 6,816 + 0,000074 \text{ CAR} - 0,038430 \text{ PAP} + 0,000208 \text{ PAP}^2 - 0,000101 \text{ CAR MET}$$

onde:

ACEIT = aceitação do consumidor

CAR = avaliação entre 0 e 100 do teor de CARAMELO feita por equipe ADQ

PAP = avaliação entre 0 e 100 do teor de PAPELÃO feita por equipe ADQ

MET = avaliação entre 0 e 100 do teor de METÁLICO feita por equipe ADQ

Utilizando-se esse modelo e substituindo-se os resultados da análise descritiva quantitativa, é possível modelar a aceitação do consumidor em relação às amostras, desde que a equipe de provadores tenha sido treinada utilizando como referência os níveis dos atributos apresentados neste trabalho. Para qualquer escala utilizada, os resultados da análise descritiva tem que ter seus valores normalizados entre 0 e 100 para uso no modelo real.

4.1.2.1 Avaliação da influência dos fatores sobre a estabilidade sensorial da cerveja

O gráfico de pareto da Figura 4-2 mostra que a intensidade do atributo papelão é o fator que afeta mais negativamente a aceitação do consumidor, seguido pela interação entre os atributos metálico e caramelo. O teor de caramelo isolado tem efeito limitado sobre a aceitação.

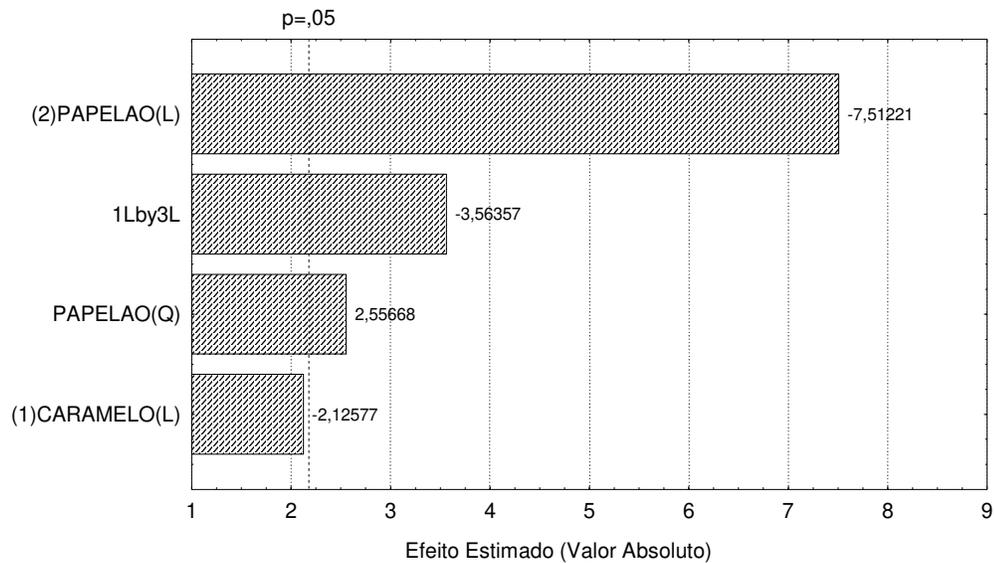


Figura 4-2. Gráfico de Pareto dos efeitos e suas interações sobre a aceitação das amostras pelo consumidor. Efeitos: (1) Caramelo; (2) Papelão; (3) Metálico.

A avaliação dos resultados pelas superfícies de resposta nos leva às seguintes conclusões:

- i) Figura 4-3. (Caramelo x Papelão): de modo geral, quanto menor o teor do atributo PAPELÃO, maior a aceitação. O atributo CARAMELO tem influência muito baixa sobre a aceitação. Região de ótima aceitação: níveis mínimos de CARAMELO e de PAPELÃO.

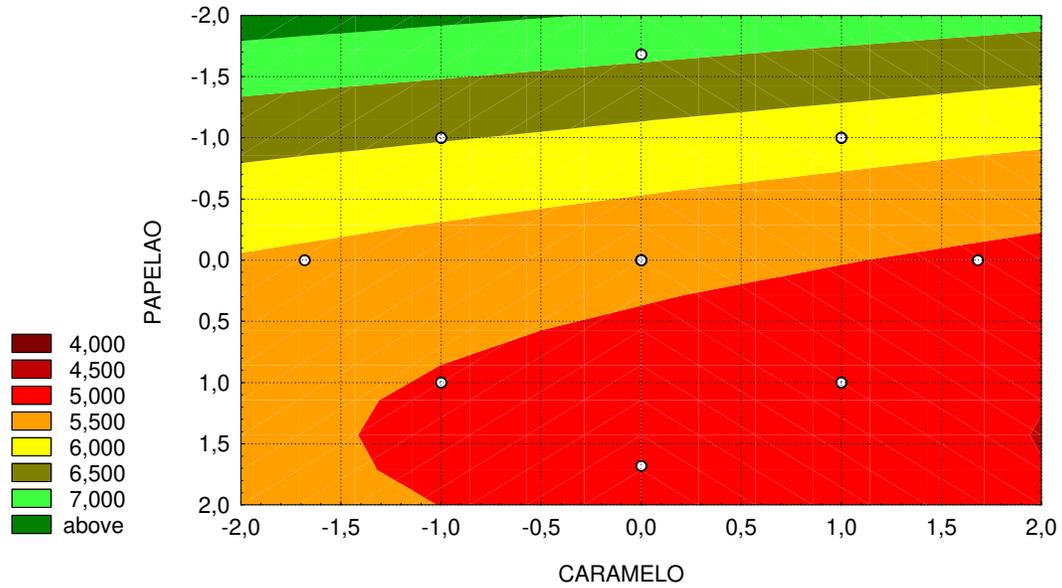


Figura 4-3. Superfície de resposta das notas de aceitação influenciadas pelos níveis dos atributos Caramelo e Papelão.

ii) Figura 4-4. (Papelão x Metálico): quanto menor o teor do atributo PAPELÃO, maior a aceitação. O atributo METÁLICO não tem influência sobre a aceitação. Região de ótima aceitação: níveis mínimos de PAPELÃO e qualquer nível de METÁLICO.

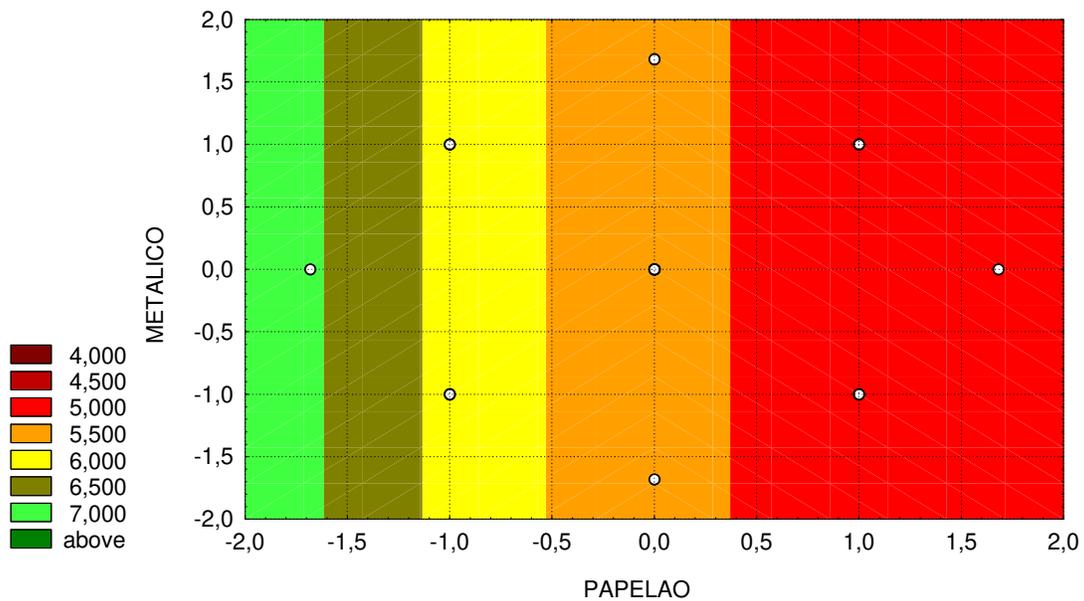


Figura 4-4. Superfície de resposta das notas de aceitação influenciadas pelos níveis dos atributos Papelão e Metálico.

iii) Figura 4-5. (Caramelo x Metálico): os fatores CARAMELO e METÁLICO interagem fortemente e influenciam as notas de aceitação. A presença simultânea dos dois atributos na cerveja, em níveis mais elevados reduz fortemente a aceitação. É muito interessante notar também que a ausência dos dois atributos simultaneamente também é prejudicial à aceitação. Regiões de ótima aceitação: nível mínimo de METÁLICO combinado com nível máximo de CARAMELO, ou vice-versa, nível máximo de METÁLICO combinado com nível mínimo de CARAMELO.

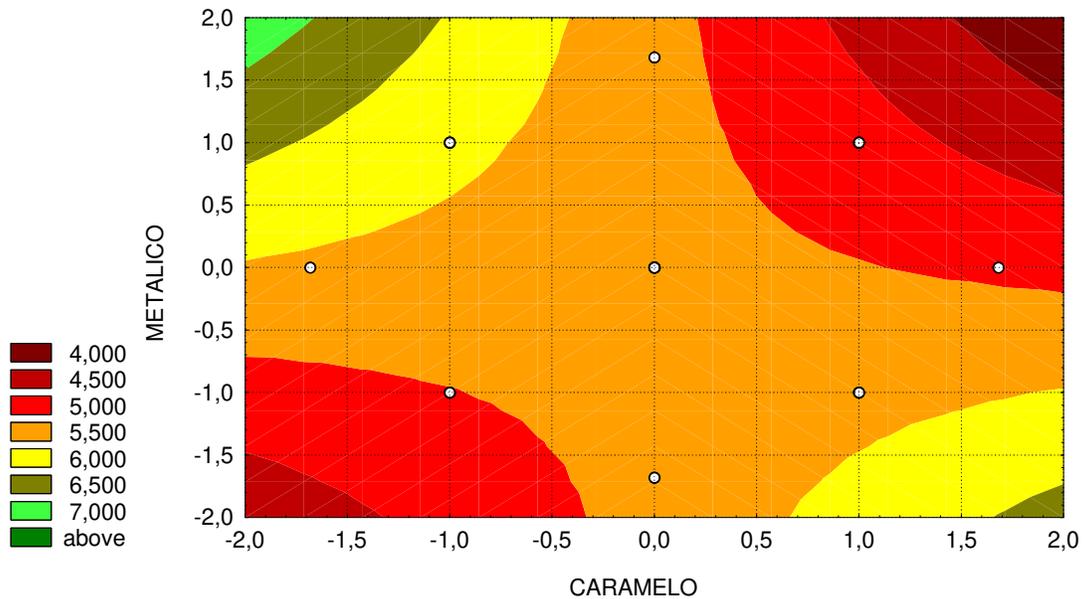


Figura 4-5. Superfície de resposta das notas de aceitação influenciadas pelos níveis dos atributos Caramelo e Metálico.

Agrupando as conclusões das três superfícies de resposta temos que devemos manter níveis mínimos do atributo PAPELÃO para maximizar a aceitação da cerveja Pilsen pelo consumidor. Como relação ao atributo CARAMELO, seu nível ótimo depende fortemente do nível do atributo METÁLICO. Como o atributo CARAMELO tem uma fraca interação com o atributo PAPELÃO, o máximo de aceitação da cerveja pelo consumidor se dará com níveis mínimos de atributo CARAMELO, níveis máximos do atributo METÁLICO, associados a níveis mínimos de atributo PAPELÃO.

4.2 Envelhecimento forçado

4.2.1 Teste de aceitação

O gráfico de média das notas de aceitação (Figura 4-6) mostra que os consumidores avaliaram as amostras de forma mediana, sem grandes nem pequenas notas de aceitação, variando fortemente as notas em torno do valor 6 da escala (Gostei ligeiramente).

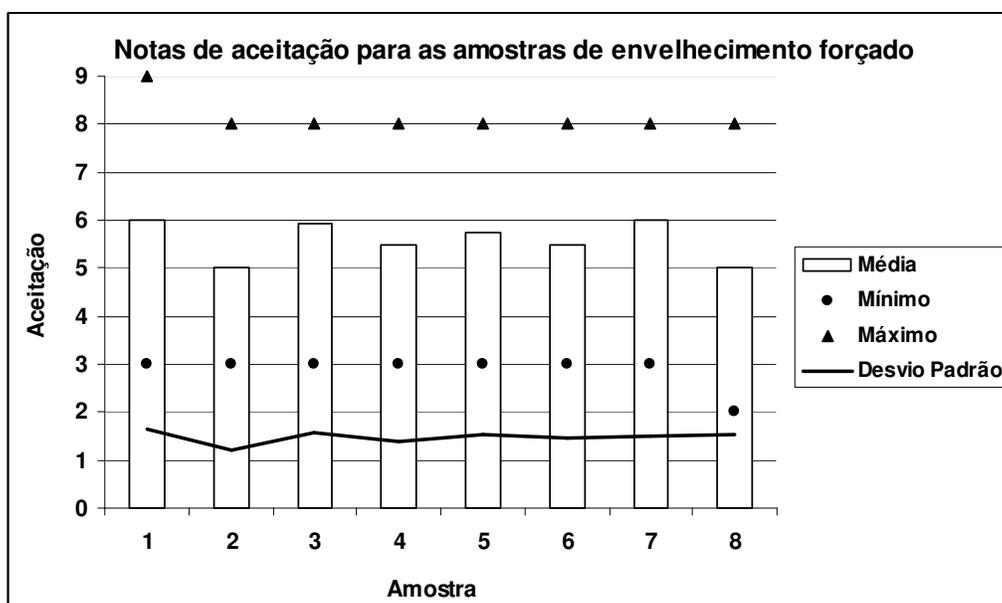


Figura 4-6. Gráfico dos resultados de aceitação obtidos da avaliação das 8 amostras com envelhecimento forçado, feita por 27 provadores. As amostras de 1 a 8 representam cada um dos ensaios do planejamento de experimento.

A análise de variância (Tabela 4-10) os resultados de aceitação das oito amostras mostra que existe diferença significativa de aceitação entre as amostras envelhecidas, ao nível de 5% de significância. Pelo teste de diferença de médias de Tukey, a mínima diferença significativa (MDS) entre as amostras a $p < 0,05$ é de 1,16 (8 tratamentos; 182 graus de liberdade do resíduo; $q = 4,29$; 27 julgamentos por amostra). A maior diferença entre médias é 1,00. O teste de Tukey é mais sensível que a análise de variância, por isso a maior diferença entre as amostras é menor que a MDS, apesar de a ANOVA haver mostrado que existe diferença no teste F. De qualquer modo, as amostras que

apresentaram as menores notas foram a 2 (temperatura) e a 8 (temperatura, luz e agitação). As com maior nota de aceitação foram as amostras 1 (cerveja fresca), 3 (agitação) e 7 (agitação e luz). As amostras que sofreram o efeito da temperatura (2, 4, 6 e 8) tiveram menores notas que as demais amostras (1, 3, 5 e 7). Esse efeito se percebe também no gráfico de pareto dos efeitos (Figura 4-7), onde o único efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) sobre a aceitação da cerveja é a temperatura. Nem mesmo a interação entre os outros tratamentos (luz e agitação) com a temperatura se mostra significativa.

Tabela 4-10. Análise de Variância dos resultados de aceitação obtidos da avaliação das 8 amostras com envelhecimento forçado, feita por 27 provadores. O teste F mostra que existe diferença significativa de aceitação entre as amostras a $p < 0,05$.

FV	GL	SQ	SQM	F	Ftab (5%)
Amostra	7	32,1	4,592	2,32	2,06
Provador	26	98,3	3,780	1,91	1,56
Resíduo	182	360,2	1,979		
Total	215	490,7			

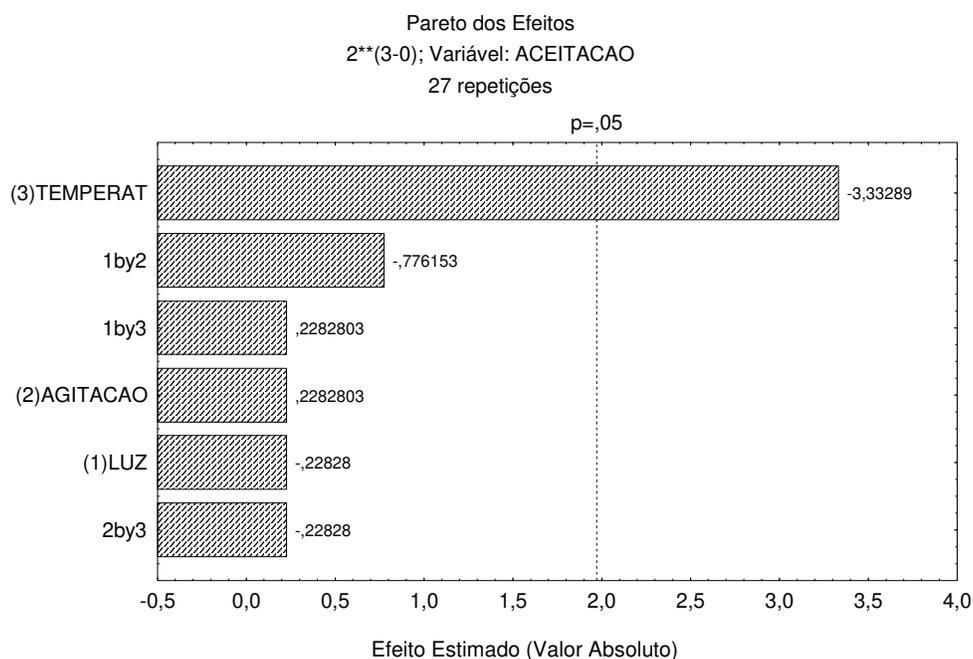


Figura 4-7. Gráfico de pareto dos efeitos (Temperatura, Agitação e Luz) e suas interações sobre a aceitação das 8 amostras com envelhecimento forçado, feita por 27 provadores. O teste F mostra que o único fator afeta significativamente a aceitação a $p < 0,05$ é a temperatura. “1by2”, “1by3” e “2by3” representam as interações entre os fatores principais luz (1), agitação (2) e temperatura (3).

4.2.2 Teste descritivo da equipe da cervejaria

As notas da análise sensorial descritiva realizada pelos provadores treinados estão detalhadas na Tabela 4-11. Essas mesmas notas estão representadas nos gráficos de consenso entre os provadores (Figura 4-8, Figura 4-9 e Figura 4-10), para cada um dos três atributos. Graficamente se percebe bom consenso entre os provadores, principalmente para o atributo papelão.

O gráfico tipo radar (Figura 4-11) mostra o perfil sensorial de cada uma das 8 amostras. O perfil das amostras é muito similar para os atributos metálico e caramelo. A amostra que sofreu os efeitos da temperatura e incidência de luz se destaca por possuir maiores notas no atributo caramelo. As amostras que sofreram efeitos de temperatura e agitação, e temperatura, agitação e luz se destacam por possuírem maiores notas no atributo metálico. Para o atributo papelão se nota maior dispersão entre os perfis das amostras.

Tabela 4-11. Notas da análise sensorial descritiva realizadas por provadores treinados de uma cervejaria comercial brasileira de grande porte. As amostras de 1 a 8 representam cada um dos ensaios do planejamento de experimento.

Amostra	Notas da análise descritiva														
	Papelão					Metálico					Caramelo				
	Provador 1	Provador 2	Provador 3	Provador 4	Provador 5	Provador 1	Provador 2	Provador 3	Provador 4	Provador 5	Provador 1	Provador 2	Provador 3	Provador 4	Provador 5
1	2	5	5	6	2	0	5	0	0	1	1	1	1	3	0
2	9	8	7	10	7	3	1	0	2	0	1	3	1	4	0
3	7	4	6	4	3	3	1	0	1	0	1	4	2	2	0
4	10	7	6	10	7	4	0	1	1	2	1	2	2	5	1
5	5	5	10	6	2	2	1	0	0	2	1	4	1	3	0
6	10	7	8	9	8	2	0	1	0	3	4,5	3	6	5	0
7	3	5	9	4	4	1	0	8	2	0	0,7	5	1	1	0
8	9,4	6	7	9	7	1	0	1	1	9	0,5	3	1	4	0

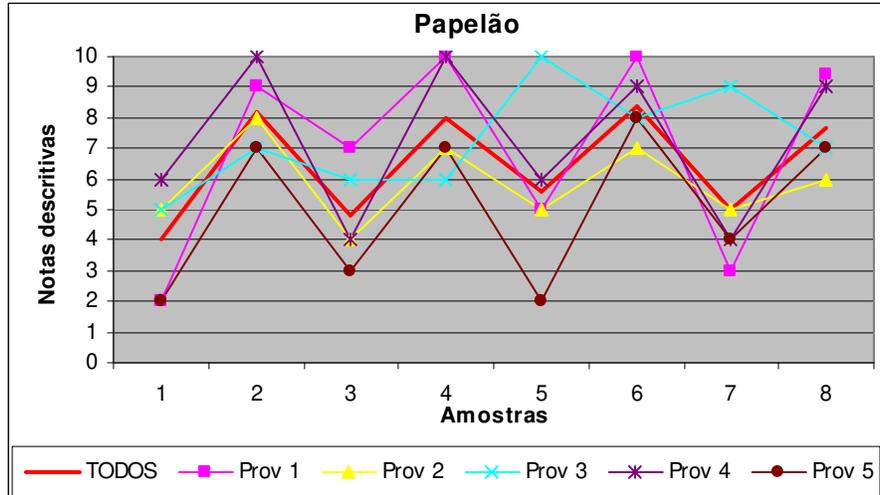


Figura 4-8. Gráfico de consenso entre os provadores (Prov 1, 2, 3, 4 e 5) na análise sensorial descritiva do atributo papelão, realizada por provadores treinados de uma cervejaria comercial. As amostras de 1 a 8 representam cada um dos ensaios do planejamento de experimento. "TODOS" representa a média aritmética das notas dos 5 provadores.

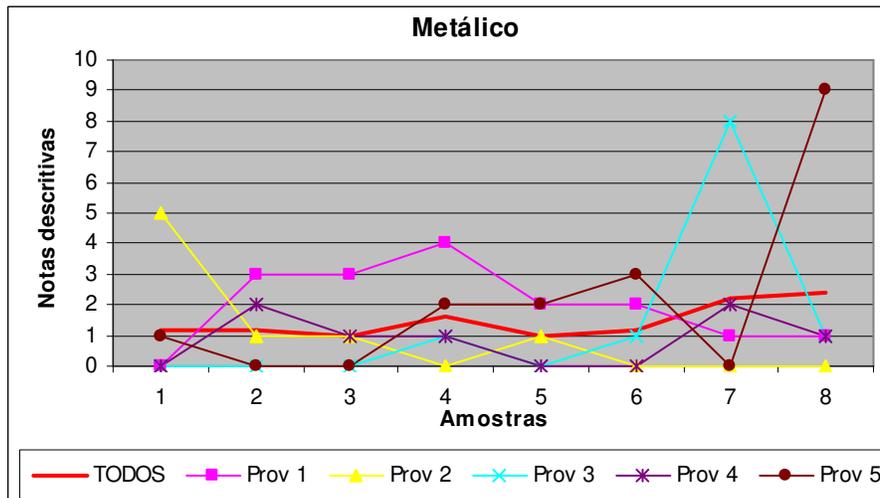


Figura 4-9. Gráfico de consenso entre os provadores (Prov 1, 2, 3, 4 e 5) na análise sensorial descritiva do atributo metálico, realizada por provadores treinados de uma cervejaria comercial. As amostras de 1 a 8 representam cada um dos ensaios do planejamento de experimento. "TODOS" representa a média aritmética das notas dos 5 provadores.

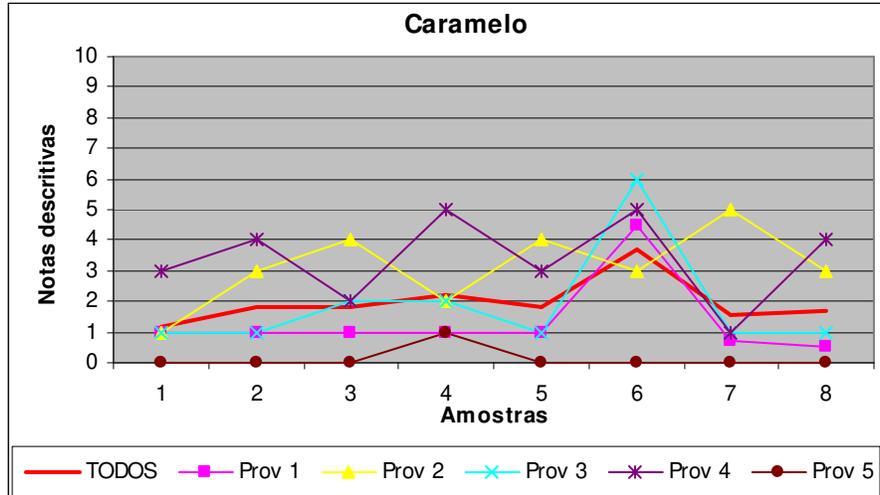


Figura 4-10. Gráfico de consenso entre os provadores (Prov 1, 2, 3, 4 e 5) na análise sensorial descritiva do atributo caramelo, realizada por provadores treinados de uma cervejaria comercial. As amostras de 1 a 8 representam cada um dos ensaios do planejamento de experimento. “TODOS” representa a média aritmética das notas dos 5 provadores.

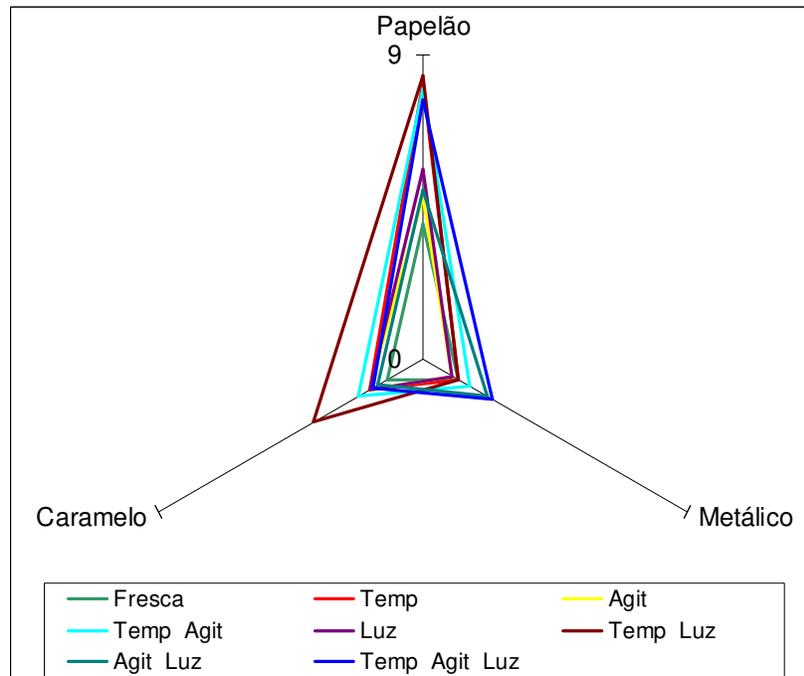


Figura 4-11. Gráfico tipo radar das médias aritméticas das notas descritivas para cada uma das 8 amostras envelhecidas. Temp = temperatura; Agit = Agitação; Luz = Incidência de luz.

A análise de variância dos resultados (Tabela 4-12, Tabela 4-13 e Tabela 4-14) mostra estatisticamente em que as amostras diferem entre si, de acordo com a avaliação dos provadores treinados da cervejaria, confirmando a impressão visual do gráfico tipo

radar (Figura 4-11). No atributo papelão, as amostras diferem entre si ao nível de 99,99% de significância. No atributo metálico, as amostras não diferem entre si ao nível de 90% de significância. Para o atributo caramelo, existe diferença entre as amostras a 90% de significância.

Tabela 4-12. Análise de variância das notas da análise sensorial descritiva das amostras de envelhecimento forçado, para o atributo papelão, realizada por provadores treinados de uma cervejaria comercial. A análise mostra que existe diferença significativa entre as amostras no atributo papelão a $p < 0,001$.

ANOVA Papelão						
<i>Causa de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>SQM</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crit</i>
Provadores	31,51	4	7,876	2,66	0,05351	2,71
Amostras	111,65	7	15,950	5,38	0,00055	2,36
Resíduo	82,94	28	2,962			
Total	226,10	39				

Tabela 4-13. Análise de variância das notas da análise sensorial descritiva das amostras de envelhecimento forçado, para o atributo metálico, realizada por provadores treinados de uma cervejaria comercial. A análise mostra que não existe diferença significativa entre as amostras no atributo metálico a $p < 0,10$.

ANOVA Metálico						
<i>Causa de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>SQM</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crit</i>
Provadores	10,35	4	2,587	0,51	0,72673	2,71
Amostras	10,37	7	1,482	0,29	0,95068	2,36
Resíduo	141,25	28	5,045			
Total	161,98	39				

Tabela 4-14. Análise de variância das notas da análise sensorial descritiva das amostras de envelhecimento forçado, para o atributo caramelo, realizada por provadores treinados de uma cervejaria comercial. A análise mostra que existe diferença significativa entre as amostras no atributo caramelo a $p < 0,10$.

ANOVA Caramelo						
<i>Causa de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>SQM</i>	<i>F</i>	<i>Valor P</i>	<i>F crit</i>
Provadores	56,97	4	14,242	10,42	2,7E-05	2,71
Amostras	19,92	7	2,8451	2,08	0,07928	2,36
Resíduo	38,26	28	1,3665			
Total	115,15	39				

Para definir quais amostras diferiam entre si nos atributos papelão e caramelo, foi realizado o teste de diferença de médias de Tukey. Para o atributo papelão, a mínima diferença significativa (MDS) calculada entre as médias foi de 3,55. Para o atributo caramelo, MDS = 2,41. Parâmetros usados para o cálculo do MDS: GL resíduo = 28; número de tratamentos: 8; julgamentos por amostra: 5; $q = 4,61$ (tabelado a 5% de significância). A Tabela 4-15 mostra o resumo das médias das amostras e detalha quais amostras diferem entre si.

No atributo papelão, o efeito do envelhecimento forçado pela temperatura foi definitivamente o mais impactante, fazendo com que todas as amostras aquecidas (2, 4, 6 e 8) se tornassem significativamente diferentes das demais. A combinação dos tratamentos com temperatura e luz foi sinérgica (média 8,4 para papelão), fazendo com que essa amostra (6) se diferenciasse significativamente também da amostra tratada por agitação apenas (3).

Com relação ao atributo caramelo, apenas as amostras 1 (fresca) e 6 (temperatura e luz) se mostraram significativamente diferentes na opinião dos provadores treinados da cervejaria. Novamente, o efeito sinérgico dos dois tratamentos (temperatura e luz) se mostrou o mais impactante. Vale observar que o tratamento 8 (temperatura, luz e agitação) não mostrou o mesmo impacto sobre o atributo caramelo, assim como sobre o atributo papelão.

Tabela 4-15. Média das notas sensoriais descritivas da equipe treinada de provadores da cervejaria. Fatores de envelhecimento: Temp = temperatura; Agit = Agitação; Luz = Incidência de luz. Médias codificadas com letras iguais para um mesmo atributo não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Ensaio	Condição	Médias das Notas Descritivas		
		Papelão	Metálico	Caramelo
1	Fresca	4,0 a	1,2 a	1,2 a
2	Temp	8,2 b, c	1,2 a	1,8 a, b
3	Agit	4,8 a, b	1,0 a	1,8 a, b
4	Temp Agit	8,0 b, c	1,6 a	2,2 a, b
5	Luz	5,6 a, b, c	1,0 a	1,8 a, b
6	Temp Luz	8,4 c	1,2 a	3,7 b
7	Agit Luz	5,0 a, b, c	2,2 a	1,5 a, b
8	Temp Agit Luz	7,7 b, c	2,4 a	1,7 a, b

Concluindo, o tratamento por temperatura se mostrou importante sobre a percepção do atributo papelão na opinião dos provadores da cervejaria. Ainda na opinião desses provadores, a incidência de luz causou efeito sinérgico com a temperatura elevada, levando a diferenças no atributo caramelo. Nenhum dos tratamentos causou impacto estatisticamente significativo sobre o atributo metálico. A agitação das amostras como fator de envelhecimento não se mostrou estatisticamente significativa na opinião desses provadores.

4.2.3 Inclusão dos resultados descritivos no modelo proposto

As médias das notas dos provadores da cervejaria para cada um dos atributos foram inserida nos modelo matemático real. Como o modelo real foi construído com notas entre 0 e 100 (ver item 4.1.2), as notas dos provadores foram também normalizadas para esse intervalo para poderem ser utilizadas. Relembrando o modelo:

$$\text{ACEIT} = 6,816 + 0,000074 \text{ CAR} - 0,038430 \text{ PAP} + 0,000208 \text{ PAP}^2 - 0,000101 \text{ CAR MET}$$

As notas descritivas normalizadas de cada provador para cada atributo (caramelo, metálico e papelão) foram aplicadas no modelo. Com isso, cada provador gerou uma nota de aceitação modelada para cada uma das oito amostras (Tabela 4-16). Para avaliar estatisticamente o resultado, realizou-se a análise de variância (Tabela 4-17), de onde se conclui que existe diferença significativa entre a aceitação modelada das amostras a $p < 0,01$. Esse resultado era esperado, pois o fator de maior representabilidade no modelo matemático foi o atributo papelão, no qual as amostras diferiram significativamente. Na análise das médias dos resultados de aceitação modelada pelo teste de médias de Tukey (Tabela 4-18), vemos que, novamente, as amostras que sofreram a ação da temperatura no envelhecimento forçado diferiram da amostra fresca.

Tabela 4-16. Aceitação modelada a partir das notas descritivas dos provadores treinados na cervejaria. As notas sensoriais foram normalizadas para o intervalo de 0 a 100 para poderem ser usadas no modelo. Com essas notas, foi calculada a aceitação usando o modelo. As amostras de 1 a 8 representam os ensaios do planejamento do experimento.

	Amostras							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Provador 1	6,13	5,01	5,12	5,01	5,40	4,97	5,84	5,04
Provador 2	5,36	5,04	5,57	5,15	5,38	5,15	5,42	5,26
Provador 3	5,42	5,15	5,26	5,24	5,05	5,02	4,96	5,14
Provador 4	5,26	4,98	5,59	5,01	5,26	5,05	5,59	5,00
Provador 5	6,13	5,15	5,85	5,13	6,13	5,07	5,61	5,15

Tabela 4-17. Análise de variância dos resultados de aceitação modelados a partir das notas da análise sensorial descritiva feita por provadores treinados da cervejaria. A análise mostra que existe diferença significativa entre a aceitação modelada das amostras a $p < 0,01$.

<i>Fonte de Variação</i>	<i>SQ</i>	<i>GL</i>	<i>SQM</i>	<i>F</i>	<i>Valor-P</i>	<i>F crit</i>
Provadores	0,6381	4	0,1595	2,6722	0,0526	2,7141
Amostras	2,0308	7	0,2901	4,8596	0,0011	2,3593
Resíduo	1,6716	28	0,0597			
Total	4,3405	39				

Tabela 4-18. Médias de aceitação modelada com as notas sensoriais descritivas. Fatores de envelhecimento: Temp = temperatura; Agit = Agitação; Luz = Incidência de luz. Médias codificadas com letras iguais para um mesmo atributo não diferem entre si, pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

Ensaio	Condição	Média de aceitação modelada
1	Fresca	5,66 a
2	Temp	5,06 b
3	Agit	5,48 a, b
4	Temp Agit	5,11 b
5	Luz	5,44 a, b
6	Temp Luz	5,05 b
7	Agit Luz	5,49 a, b
8	Temp Agit Luz	5,12 b

Comparando-se o resultado de aceitação real com o resultado de aceitação modelada (Figura 4-12) percebemos uma diferença entre -2 e 9%, com variação média de 4,8% de diferença. Essa proximidade entre os valores reais e os valores modelados mostra a aplicabilidade do modelo para prever a aceitação do consumidor a partir dos dados da análise descritiva dos provadores treinados. A partir desses resultados vemos que os provadores treinados de uma cervejaria podem exprimir a aceitação do

consumidor a partir de seu julgamento técnico. Quanto mais criteriosa for a análise sensorial descritiva na cervejaria, maior será a possibilidade de prever a aceitação do consumidor.

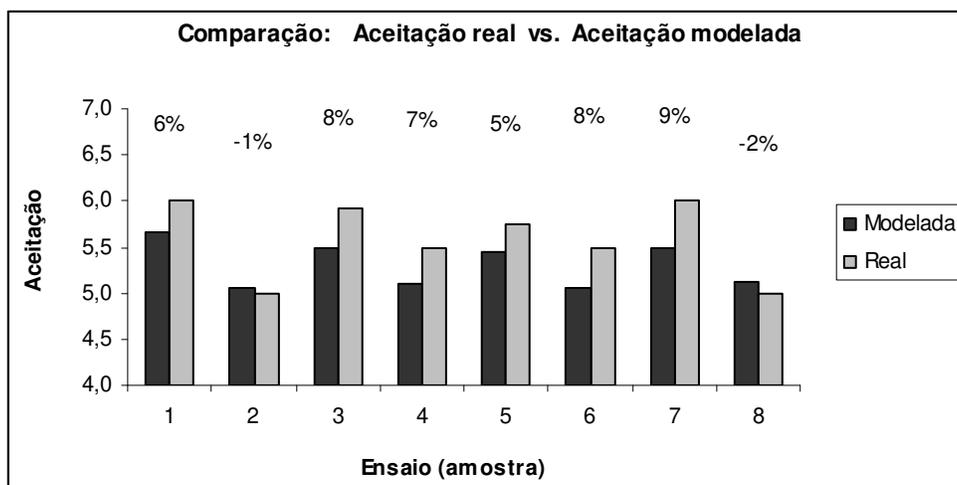


Figura 4-12. Comparação das médias de aceitação modelada com as médias de aceitação reais. Os percentuais para cada amostra representam a diferença entre os valores reais e os valores modelados.

4.2.4 Análises químicas

4.2.4.1 Teores de trans-2-nonenal

Diversos trabalhos científicos relatam a presença de trans-2-nonenal (T2N) em cerveja, em concentrações crescentes com o tempo de vida de prateleira e oxidação do produto. Os teores de T2N, contudo, mostram grande variação de um trabalho para outro. A Tabela 4-19 traz uma compilação dos teores de T2N relatados na literatura. Diferentes fatores influem sobre a formação do T2N na cerveja, como a quantidade de seus precursores no produto, o teor de agentes redutores como SO₂, e as condições de envelhecimento. Além disso, as metodologias de determinação também variam entre os trabalhos, sendo, certamente, uma causa de desvios quando se comparam os valores. Para comparação, a Figura 4-14 traz os resultados de teores de T2N obtidos a partir das amostras de envelhecimento forçado deste trabalho. Um exemplo dos cromatogramas obtidos é mostrado na Figura 4-13.

Tabela 4-19 Teores de trans-2-nonenal relatados na literatura. T2N = trans-2-nonenal.

Autor(s) (ano)	Teor de T2N na cerveja fresca ($\mu\text{g/l}$)	Condição de envelhecimento	Teor de T2N na cerveja envelhecida ($\mu\text{g/l}$)
Meilgaard (1975, 1979)			3,0
Greenhoff & Wheeler (1981)	0,06 – 0,08	60°C – 2 dia s	0,48
Hashimoto (1981)	0,003		
Narziss (1986, 1993)	< 0,02	40°C – 7 dias	0,15 – 0, 16
Drost et al. (1990)		Natural - 6 meses	0,25
Kaneda & Kamimura (1992)			3,0
Sakuma & Kowaka (1994)	0,07	38°C – 8 dias	0,20
Wackerbauer & Zufall (1998)	0,1	28°C – 28 dias	0,6
Liegeois et al. (1999)	0,09	40°C – 5 dias	0,31
Simpson & Mairs (2005)	< 0,05		> 2.000.000
Techakriengkrai et al. (2006)	0,0084	37°C – 28 dias	0,0309

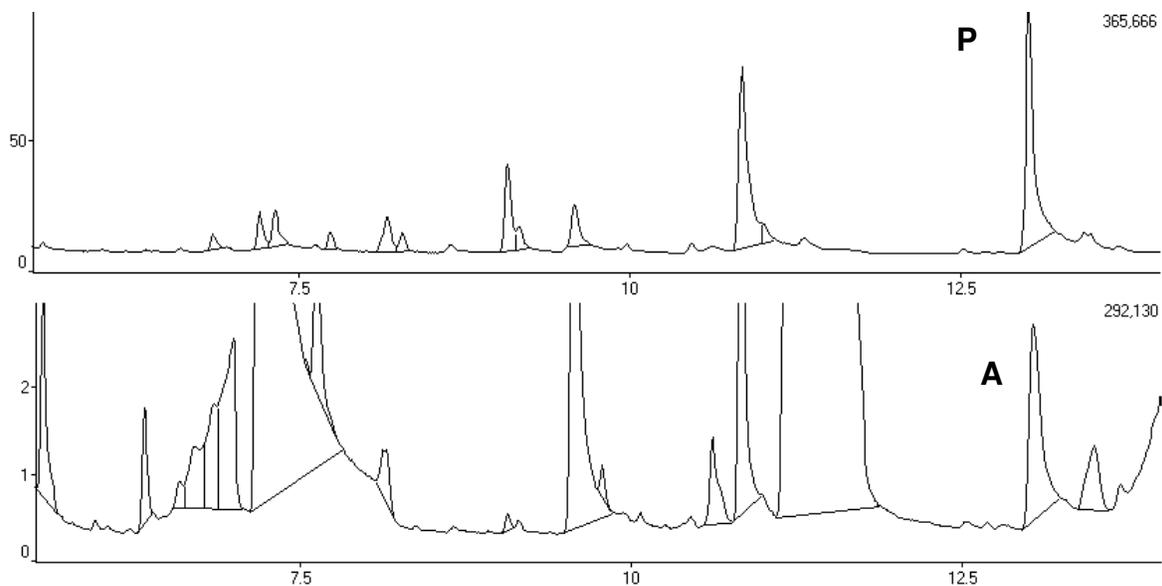


Figura 4-13. Cromatogramas de determinação de trans-2-nonenal por CG-MS. P = pico do sistema modelo com 10 ppb de T2N; A = pico da amostra número 5

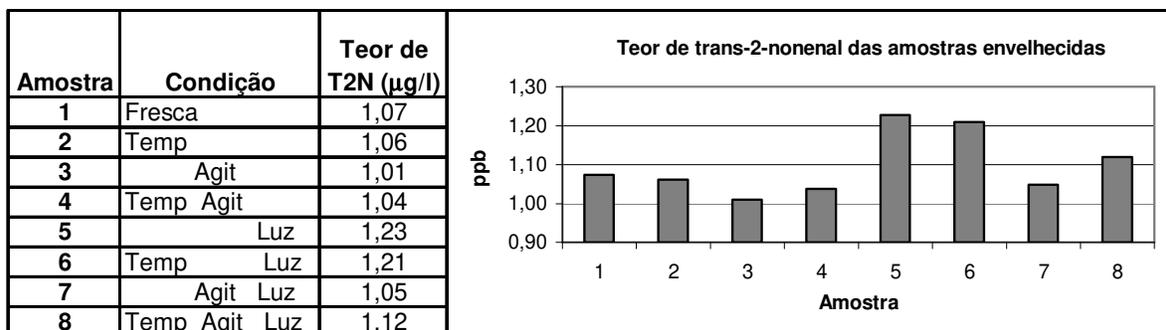


Figura 4-14. Resultado da determinação de trans-2-nonenal das amostras envelhecidas em laboratório. As amostras de 1 a 8 representam cada um dos ensaios do planejamento de experimento.

Os resultados obtidos neste trabalho apresentaram valores coerentes com os que estão citados na maioria dos trabalhos da literatura. O trabalho que traz dados mais completos sobre teores de T2N é o de Techakriengkrai et al. (2006), e a metodologia de determinação é a mesma utilizada nesta tese. Seus resultados mostram valores de 0,0084 µg/l para a cerveja fresca “A” e 0,0022 µg/l para “B”; na cerveja submetida à temperatura de 37°C por 28 dias (condição mais extrema utilizada), os valores foram de 0,0309 µg/l e 0,0054 µg/l, respectivamente.

O limiar de detecção de T2N em cerveja é citado como sendo 0,3 µg/l por Hashimoto (1981) e 0,05 – 0,10 µg/l por Simpson & Mairs (2005). Os valores aqui determinados estão entre 1,01 e 1,23 ppb, ou seja, acima dos limites de detecção relatados. Isso justifica a detecção do atributo papelão pelos provadores treinados da cervejaria. Contudo, a correlação linear entre o resultados das determinações e as notas da análise descritiva (Figura 4-15) apresentou valor muito pouco significativo ($R^2=0,07$). Essa baixa correlação sugere que a percepção sensorial do atributo papelão pode estar sendo influenciada por outros atributos sensoriais presentes nas amostras. Alguns fatores podem estar potencializando e outros podem estar inibindo a percepção do atributo papelão em algumas amostras.

As amostras menos aceitas pelos consumidores foram exatamente as que apresentaram maiores notas da equipe de provadores treinados para o atributo papelão. Como existe pouca correlação entre o teor de T2N e as notas sensoriais para o atributo papelão, existe também pouca correlação entre o teor de T2N e a aceitação dos consumidores.

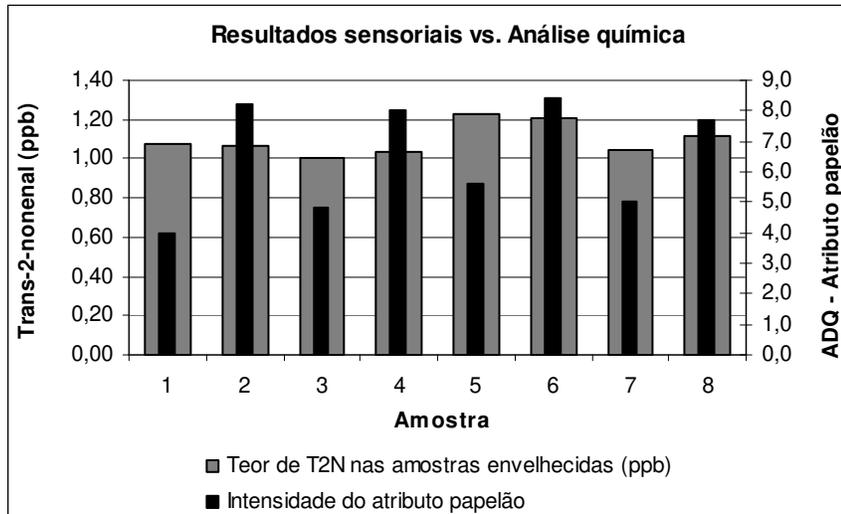


Figura 4-15. Comparação dos teores de trans-2-nonenal analisados, com as notas dadas pela equipe de provadores treinados para o atributo papelão.

De acordo com a Figura 4-16, o teor de T2N é influenciado significativamente ($p < 0,10$) pela incidência de luz e pela agitação. Essa conclusão é conflitante com o fato de que a temperatura se mostrou o principal efeito sobre a estabilidade sensorial, definida por consumidores e provadores treinados. A incidência de luz e a agitação se mostraram pouco influentes sobre a estabilidade sensorial, mas muito influentes sobre a formação de T2N. Esse resultado mostra que o teor de T2N não pode ser usado como indicador único da estabilidade sensorial da cerveja.

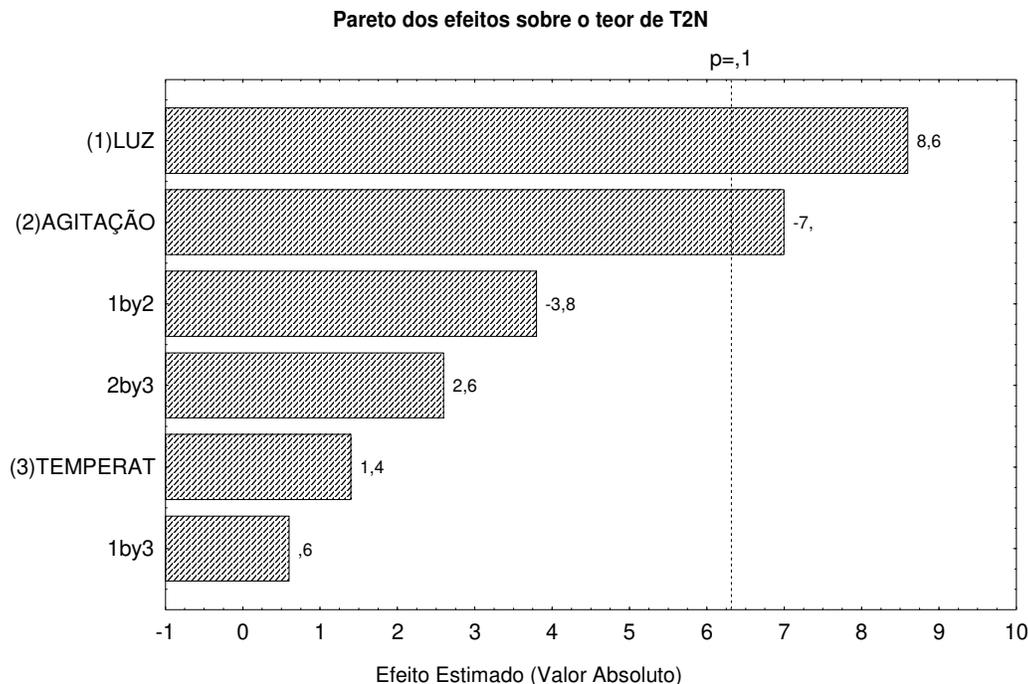


Figura 4-16. Gráfico de pareto dos efeitos sobre o teor de trans-2-nonenal das amostras submetidas ao envelhecimento forçado.

4.2.4.2 Cor

A análise dos resultados de cor (Figura 4-17) das amostras confirma os resultados sensoriais. As amostras com coloração mais elevada são exatamente aquelas envelhecidas sob o efeito da temperatura (amostras 2, 4, 6 e 8), que foram as menos aceitas por consumidores e que receberam as maiores pontuações de papelão dadas pela equipe treinada de provadores. A amostra de menor cor é a amostra fresca (1), que não sofreu envelhecimento forçado. Contudo o coeficiente de correlação linear entre as duas variáveis não se mostrou significativo ($R^2 = 0,53$).

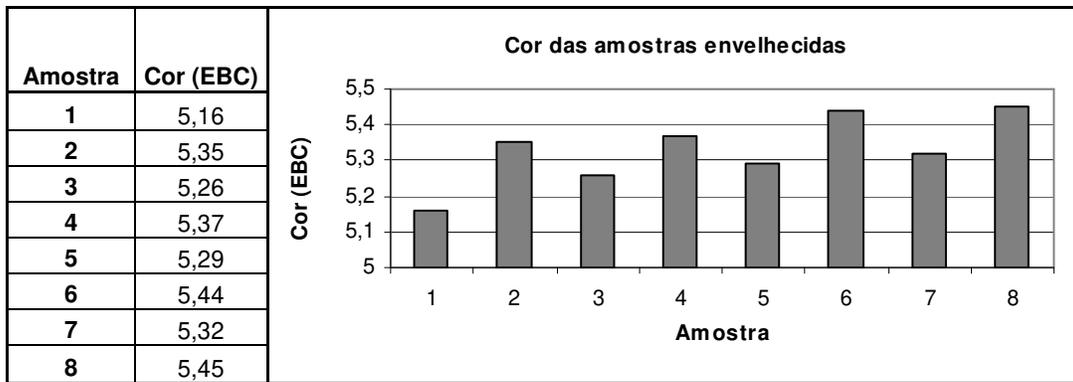


Figura 4-17. Resultado da determinação de cor das amostras envelhecidas em laboratório. As amostras de 1 a 8 representam cada um dos ensaios do planejamento de experimento.

5 Conclusões

5.1 Influência da temperatura, da agitação e da incidência de luz sobre a estabilidade sensorial

Dentre as três variáveis testadas (temperatura, agitação e incidência de luz), a única que apresentou efeito estatisticamente significativo sobre a estabilidade sensorial foi a temperatura. Essa evidência resulta:

- ✓ da análise sensorial por provadores treinados;
- ✓ da aceitação do produto pelo consumidor;
- ✓ dos resultados de análise de cor e teores de trans-2-nonenal.

No meio técnico e na literatura das cervejarias se busca, de forma geral, evitar a exposição da cerveja a esses três fatores (luz, temperatura e agitação). Todavia, foi mostrado neste trabalho que os efeitos da luz e da agitação sobre a qualidade sensorial da cerveja não são estatisticamente significativos.

5.2 Influência da temperatura, da agitação e da incidência de luz sobre os teores de trans-2- nonenal

Os teores de trans-2-nonenal das cervejas submetidas ao envelhecimento forçado não apresentaram correlação com a estabilidade sensorial das amostras julgadas por consumidores e por provadores treinados.

A incidência de luz e a agitação foram os fatores mais relevantes sobre a formação de trans-2-nonenal na cerveja testada. Isso mostra que o teor de trans-2-nonenal é um indicativo, mas não pode ser tomado como única variável para a definição da estabilidade sensorial da cerveja tipo Pilsen.

5.3 Principais ações práticas para prevenir a degradação sensorial da cerveja tipo Pilsen

Em face da conclusão de que a temperatura é o principal fator influente sobre a estabilidade sensorial, todos os esforços devem ser concentrados para a redução da temperatura, desde a saída da enchedora até o ponto de venda do produto. As ações incluem:

- ✓ redução de tempo de pasteurização (pasteurização flash é o tipo ideal para a estabilidade sensorial);
- ✓ redução do número de unidades de pasteurização (UP's);
- ✓ redução da temperatura de estocagem na fábrica, no transporte e na estocagem em revendas e pontos de venda; uma cadeia de distribuição de produto refrigerado é o sistema ideal;
- ✓ adequação da frota de transporte do produto para longa distância e para entregas de curta distância; caminhões fechados com refrigeração seriam ideais; caminhões com boa ventilação são preferidos aos chamados “carga seca”, com lona cobrindo o produto.

5.4 Influência da intensidade dos atributos papelão, metálico e caramelo sobre a aceitação da cerveja pelo consumidor

A intensidade do atributo papelão tem efeito altamente negativo sobre a aceitação da cerveja pelo consumidor. Os atributos metálico e caramelo também contribuem sobre a aceitação, mas de maneira menos significativa que o atributo papelão. Dentro dos níveis do experimento aqui realizado, o máximo de aceitação da cerveja pelo consumidor se dá com níveis mínimos de atributo papelão, e níveis mínimos de atributo caramelo associados com níveis máximos do atributo metálico.

5.5 Análise sensorial descritiva como critério de tomada de decisão objetiva em cervejarias

Com o resultado dos testes sensoriais desse trabalho foi possível obter um modelo matemático para prever a aceitação da cerveja pelo consumidor com base nos resultados da análise sensorial descritiva feita por provadores treinados, para os atributos papelão, metálico e caramelo. Essa ferramenta usada na prática tira a subjetividade nas decisões feitas em plantas de produção de cerveja quanto à liberação ou não do produto para o mercado.

Para outros tipos de cerveja ou para outros atributos sensoriais, pode ser aplicada a mesma metodologia para a obtenção de um modelo matemático específico. A análise sensorial descritiva feita em cervejarias engloba um número bem maior de atributos (cerca de 20). Com isso, uma sugestão para trabalhos futuros é a modelagem conjunta de mais atributos, permitindo inferir sobre a aceitação do produto com base em todos os atributos e suas interações.

6 Bibliografia

- [1] ANDERSEN, M.L.; OUTTRUP, H; SKIBSTED, L.H. Potential antioxidants in beer assessed by ESR spin trapping. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v.48, p.3106-3111, 2000.
- [2] _____; SKIBSTED, L.H. Electron spin resonance spin trapping identification of radicals formed during aerobic forced aging of beer. _____, v.46, p.1272-1275, 1998.
- [3] ANDREWS, D. Beer off flavours – their cause, effect and prevention. **Cass College Lectures**, London, Autumn, p.1-6, 1986.
- [4] AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16. ed., 3ª revisão, Gaithersburg, 1997. v.2, p.27.1-27.39.
- [5] ARAKI, S.; KIMURA T.; SHIMIZU, C.; FURUSHO, S.; TAKASHIO, M; SHINOTSUKA, K. Estimation of antioxidative activity and its relationship to beer flavor stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.57, n.1, p.34-37, 1999.
- [6] _____; TAKASHIO, M.; SHINOTSUKA, K. A New Parameter for Determination of the Extent of Staling in Beer. _____, v.60, n.1, p.26-30, 2002.
- [7] ASBC - American society of Brewing Chemists. **Methods of Analysis**. 7. ed. Saint Paul: The Society, 1985. Paginação irregular. Revisado: março 1997.
- [8] AXCELL, B.; TORLINE, P. Some alternative views on beer flavor. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.35, n.2, p.91-94, 1998.
- [9] BAMFORTH, C.W. Making sense of flavor change in beer. _____, v.37, n.2, p.165-171, 2000.

- [10] _____. A critical control point analysis for flavor stability of beer. _____, v.41, n.2, p.97-103, 2004.
- [11] _____. Oxido-reduction processes and active forms of oxygen in aqueous systems. **Cerevisia and Biotechnology**, Bruxelles, v.26, n.3, p.149-154, 2001.
- [12] BANCO DE DESENVOLVIMENTO DO ESPÍRITO SANTO S/A. Indústria cervejeira no Brasil: padrão de competição e evolução. Vitória, 2004
- [13] BARKER, R.L.; GRACEY, D.E.F.; IRWIN. A.J.; PIPASTS, P.; LEISKA, E. Liberation of staling aldehydes during storage of beer. **Journal of The Institute of Brewing**, London, v.89, p.411-415, nov./dez., 1983.
- [14] BART HASS GROUP. **Barth Report 2005**. Disponível em www.barthhaasgroup.com. Acesso em: 15/10/06
- [15] BRAVO, A.; SANCHEZ, B.; SCHERER, E.; HERRERA, J.; RANGEL-ALDAO, R. α -dicarbonylic compounds as indicators and precursors of flavor deterioration during beer aging. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.39, n.1, p.13-23, 2002.
- [16] BRENNER, M.W.; STERN, K. Dissolved oxygen and antioxidants. _____, v.7, n.3, p.150-157, 1970.
- [17] CALLEMIEN, D.; DASNOY, S.; COLLIN, S. Identification of a stale-beer-like odorant in extracts of naturally aged beer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.54, p.1409-1413, 2006.
- [18] CHAPON, L. Oxygen and beer. In: POLLOCK, J.R.A. (Ed.). **Brewing Science**. London: Academic Press, 1981. v.2, Cap.7, p.407-456.
- [19] CORZO, O; BRACHO, N. In: ASBC ANNUAL MEETING, 2002, Tucson. **Prediction of the sensory characteristics of bottled beer related to instrumental measurements**. Madison, 2002, P-27.

- [20] DADIC, M. Beer stability - A key to success in brewing. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.21, n.1, p.9-26, 1984.
- [21] DELCOUR, J.A. Malt and hop flavanoids in Pilsner beer. In: LINSKENS, H.F.; JACKSON, J.F. (Ed.). **Modern methods of plant analysis: Beer analysis**. Berlin: Springer-Verlag, 1988. v.7, Final product, p.229-230.
- [22] DROST, B.W.; VAN DE BERG, R.; FREIJEE, F. J. M.; VAN DE VELDE, E. G.; HOLLEMANS, M. Flavor Stability. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.48, n.4, p.124-131, 1990.
- [23] EBC - EUROPEAN BREWERY CONVENTION. **Analytica - EBC**. Nürnberg: EBC Analysis Committee, 1998.
- [24] FOSTER, R.T.; SAMP, E.J.; PATINO, H. Multivariate modeling of sensory and chemical data to understand staling in light beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.59, n.4, p.201-210, 2001.
- [25] FURUSHO, S.; KOBAYASHI, N.; NAKAE, N.; TAKASHIO, M.; TAMAKI, T.; SHINOTSUKA, K. A developed descriptive sensory test reveals beer flavor changes during storage. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.36, n.2, p.163-166, 1999.
- [26] GREENHOFF, K.; WHEELER, R. E. Analysis of beer carbonyls at the part per billion level by combined liquid chromatography and high pressure liquid chromatography. **Journal of The Institute of Brewing**, London, v.86, p.35-41, jan./fev., 1981.
- [27] GREGORY III, J. F. Vitamins. In: FENNEMA, O.R.(Ed.). **Food Chemistry**. 3. ed. New York: M. Dekker, 1996. Cap.8, p.559-568.
- [28] GRIGSBY, J.H.; PALAMAND, S.R. Studies on the staling of beer: the use of 2-thiobarbituric acid in the measurement of beer oxidation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.34, n.2, p.49-55, 1976

- [29] GUYOT-DECLERCK, C.; FRANÇOIS, N.; RITTER, C. ; GOVAERTS, B. ; COLLIN S. Influence of pH and ageing on beer organoleptic properties. A sensory analysis based on AEDA data. **Food Quality and Preference**, Oxford, v.16, p.157-162, 2005.
- [30] HARAYAMA, K.; HAYASE, F.; KATO, H. Evaluation by a multivariate analysis of the stale flavor formed while storing beer. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.58, n.9, p.1595-1598, 1994.
- [31] _____; HAYASE, F.; KATO, H. Contribution of stale flavor of 2-furfuryl ethyl ether and its formation mechanism in beer. _____, v.59, n.6, p.1144-1146, 1995.
- [32] HARTMEIER, C.H. Basic trials on possible industrial applications on an immobilized glucose oxidase-catalase system. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v1, n.1, p.21-26, 1979.
- [33] HASHIMOTO, N. Flavour stability of packaged beer. In: POLLOCK, J.R.A. (Ed.). **Brewing Science**. London: Academic Press, 1981. v.2, Cap.6, p.365-405.
- [34] HUGHES, P. Reducing power and sulphur compounds: Implications and functions in beer. **Cerevisia**, Bruxelles, v.25, n.1, p.59-66, 2000.
- [35] ILETT, D.R.; SIMPSON, W.J. Loss of sulphur dioxide during storage of bottled and canned beers. **Food Research International**, Essex, v.28, n.4, p.393.-396, 1995.
- [36] KANEDA, H.; KANO, Y.; OSAWA, T.; RAMARATHNAM, N.; KAWAKISHI, S.; KAMADA, K. Detection of free radicals in beer oxidation. **Journal of Food Science**, Chicago, v.53, n.3, p.885-888, 1988.
- [37] _____; KANO, Y.; KAMIMURA, M.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S. A research note - Detection of chemiluminescence produced during beer oxidation. _____, v.55, n.3, p.881-882, 1990.
- [38] _____; KAMIMURA, M. Off-flavors in beer. In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.). **Off-Flavors in Foods and Beverages**. Amsterdam: Elsevier, 1992, p.433-472.

- [39] _____; KANO, Y.; OSAWA, T.; KAWAKISHI, S.; KOSHINO, S. Free radical reactions in beer during pasteurization. **International Journal of Food Science and Technology**, v.29, n.2, p.195-200, 1994.
- [40] _____; KOBAYASHI, N.; FURUSHO, S.; SAHARA, H.; KOSHINO, S. Chemical evaluation of beer flavor stability. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.32, n.2, p.76-80, 1995.
- [41] _____; KOBAYASHI, N.; TAKASHIO, M.; TAMAKI, T.; SHINOTSUKA, K. Beer staling mechanism. _____, v.36, n.1, p.41-47, 1999.
- [42] KLIMOVITZ, R.J.; KINDRAKA, J.A. The impact of various antioxidants on flavor stability. _____, v.26, n.1, p.70-74, 1989
- [43] LABATT BREWING CO. LTD., Bordeleau, J.R. L.; Hastings, D.J. ; McGarrity, M. J. **A process is described for the preparation of a hopped malt beer. A processing liquid containing riboflavin is hopped to form the desired beverage and is subjected to actinic radiation at a wavelength adapted to decompose the riboflavin. This results in beer with enhanced light stability.** US 6 649 204 B1, 12 jan. 03.
- [44] LEWIS, M. J. AND YOUNG, T. W. **Brewing**. 1. ed. London: Chapman & Hall, 1996. 260p.
- [45] LIEGEOIS, C.; NOËL, S.; LERMUSIEAU, G.; COLLIN, S. A non-oxidative pathway for the synthesis of trans-2-nonenal during beer storage and transport. **Cerevisia - Belgian Journal of Brewing and Technology**, Bruxelles, v. 24, n.3, p.21-27, 1999.
- [46] LUZ, J. M. **Luminotécnica**. Disponível em <[http:// www.ee.pucrs.br/ ~jeanine/ InstalacoesEletricasIII/Luminotecnica.pdf](http://www.ee.pucrs.br/~jeanine/InstalacoesEletricasIII/Luminotecnica.pdf)>. Acesso em: 15/09/06.
- [47] LYNCH, P.A.; SEO, C.W. Ethylene production in staling beer. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1270-1272, 1987.

- [48] MAEDA, K. Preventive production of beer against oxidation. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.36, n.1, p. 55-59, 1999.
- [49] MATTOS, R. **Curso de Tecnologia Cervejeira**. Campinas, 2004. 114 p. Apostila do curso de Tecnologia Cervejeira do Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL).
- [50] MATTOS, R.; MORETTI, R. H. Beer drinkability – a review. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.42, n.1, p. 13-15, 2005.
- [51] MEBAK - Methodensammlung der Mitteleuropäischen Analysenkommission. Band III, 2. ed. Selbstverlag der MEBAK, Weihenstephan, 1996
- [52] MEILGAARD, M.C. Flavor chemistry of beer. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.12, n.2, p. 107-117, 1975.
- [53] _____. Beer flavor terminology. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.85, n.1, p.38-42, 1979.
- [54] _____. Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: a review. _____, v.107, n.5, p.271-286, 2001.
- [55] _____, REID, D.S. E WYBORSKI, K.A. Reference Standards for Beer Flavor Terminology System. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.40, p.119, 1982.
- [56] _____; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3. ed. Boca Raton: CRC, 1999. 387 p.
- [57] MORETTI, R. H. **Composição contendo aditivos e coadjuvantes para a preservação de bebidas**. BR. N. PI 9700132-5, 24 jan. 1997, 16 jan. 1998.
- [58] NARZISS, L. Centenary review – Technological factors of flavour stability. **Journal of The Institute of Brewing**, London, v.92, n.4, p.346-353, 1986.

- [59] _____; MIEDANER, H.; GRAF, H.; EICHHORN, P.; LUSTIG, S. Technological approach to improve flavour stability. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.30, n.1, p.48-53, 1993.
- [60] NOËL, S.; METAIS, N.; BONTE, S.; BODART, E.; PELADAN, F.; DUPIRE, S.; COLLIN, S. The use of oxygen 18 in appraising the impact of oxidation process during beer storage. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v.105, n.5, p.269-274, 1999.
- [61] OGANE, O.; YOKOYAMA, F.; HIRANO, T. Quantification of beer freshness, based on the original freshness scale. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.37, n.1, p.69-72, 2000.
- [62] SAKUMA, S.; KOWAKA, M. Flavor characteristics of cis-3-nonenal in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.52, n.2, p.37-41, 1994.
- [63] SAVEL, J. Reductones and beer ageing. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.38, n.3, p.135-144, 2001.
- [64] SCHMITT, D.J.; HOFF, J.T. Use of graphic linear scales to measure rates of staling in beer. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.3, p.901-904, 1979.
- [65] SHIMIZU, C.; NAKAMURA, Y.; MIYAI, K.; ARAKI, S.; TAKASHIO, M.; SHINOTSUKA, K. Factors affecting 5-hydroxymethyl furfural formation and stale flavor formation in beer. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.59, n.2, p.51-58, 2001.
- [66] SIMPSON, B.; MAIRS, J. **The beer flavour handbook**. 2. ed. Chinnor: FlavorActiv Limited, 2005. 72p.
- [67] SINDICERV. **Mercado**. Disponível em www.sindicerv.com.br. Acesso em 15/09/06
- [68] STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. 2. ed. San Diego: Academic, 1993. 338 p.

- [69] TAKASHIO, M.; SHINOTSUKA, K. Continuing progress with the anti-oxidative beer production system. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.38, n.1, p.41-45, 2001.
- [70] TECHAKRIENGKRAI, I.; PATERSON, A.; TAIDI, B.; PIGGOTT, J. R. Staling in two canned lager beers stored at different temperatures - sensory analyses and consumer ranking. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 112, n.1, p.28-35, 2006
- [71] _____; PATERSON, A.; TAIDI, B. Relationship of sensory staleness in two lagers to headspace concentrations of trans-2-nonenal and three staling aldehydes. _____, London, v. 112, n.1, p.36-40, 2006
- [72] UCHIDA, M.; ONO, M., Improvement for oxidative flavor stability of beer – role of OH-radical in beer oxidation. **Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas**, Madison, v.54, n.4, p.198-204, 1996.
- [73] _____. Determination of Hydrogen Peroxide in Beer and Its Role in Beer Oxidation. _____, v.57, n.4, p.145-150, 1999.
- [74] VESELY, P.; LUSK, L.; BASAROVA, G.; SEABROOKS, J.; RYDER, D. Analysis of aldehydes in beer using solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and gas chromatography / mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.51, p.6941-6944, 2003.
- [75] WACKERBAUER, K.; ZUFALL, C. Pasteurization and beer quality. **Cerevisia - Belgian Journal of Brewing and Technology**, Bruxelles, v. 23, n.1, p.37-43, 1998.
- [76] WALTERS, M.T.; HEASMAN, A.P.; HUGHES, P.S. Comparison of (+)-catechin and ferulic acid as natural antioxidants and their impact on beer flavor stability. Part 2: extended storage trials. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, Saint Paul, v.55, n.3, p.91-98, 1997.
- [77] WHITEAR, A. L. Shelf life, storage and distribution. **Cass College Lectures**, London, Spring, p.26-27, 1980.

7 Anexos

Anexo 7-1. Questionário de inscrição e seleção de provadores para participação na equipe de ADQ

Nome: _____ Data: ___ / ___ / ___

Telefone para contato: (___) _____ E-mail: _____

Data de nascimento: ___ / ___ / ___ Profissão: _____

Sexo: () Masc. () Fem. Idade: _____ anos

Local de trabalho / estudo : _____

Obrigado pelo seu interesse em participar de nossa equipe sensorial. Por favor, responda às seguintes perguntas:

1. Você poderá participar das sessões de análise sensorial nos meses de férias (dezembro, janeiro, fevereiro, julho) ?

() Sim () Não

Obs: _____

2. Você terá disponibilidade de participar de, em média, 2 sessões semanais de análise sensorial de 15 minutos cada? () Sim () Não

Obs: _____

3. Especifique os alimentos que você não pode comer ou beber por razões de saúde. Explique, por favor. _____

4. Você está tomando alguma medicação que interfira na sua capacidade de perceber odores ou sabores? Caso positivo, explique. _____

5. Marque com um (X) se você possui alguma das doenças abaixo:

() Diabetes () Hipertensão

() Hipoglicemia () Doenças bucais

6. Você está tomando algum tipo de medicamento que contra-indique o consumo de bebidas alcoólicas? () Sim () Não

7. Você está fazendo dieta? () Sim () Não

Qual e por que? _____

8. Qual a sua frequência de consumo de cerveja?

() Menos de 1 vez por mês () 1 vez por semana

() 1 a 2 vezes por mês

() 2 ou mais vezes por semana

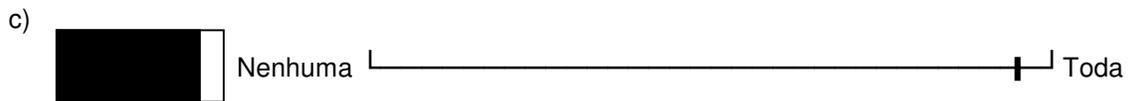
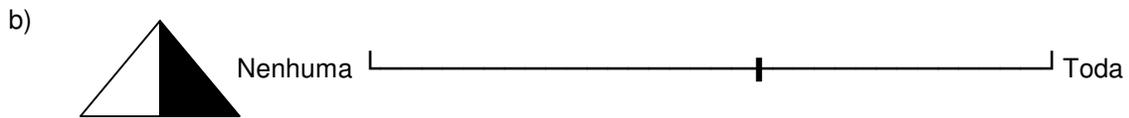
9. Assinale com um (X) as cervejas escuras:

() Malzbier () Antartica () Caracu () Brahma () Bock

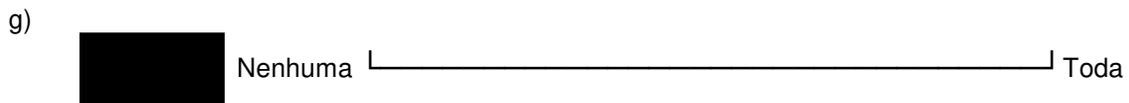
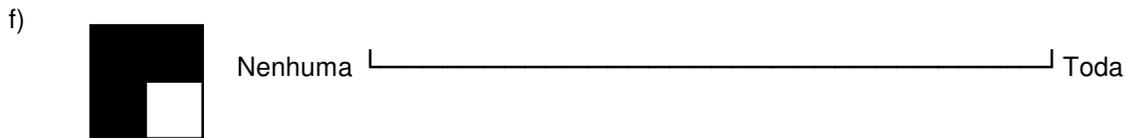
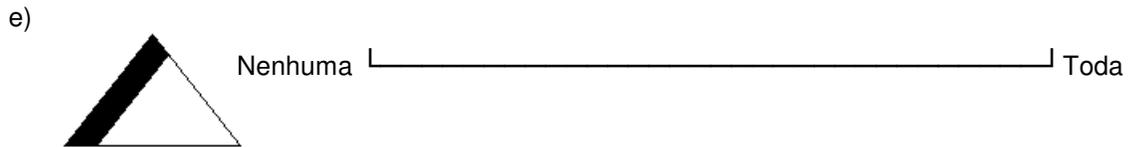
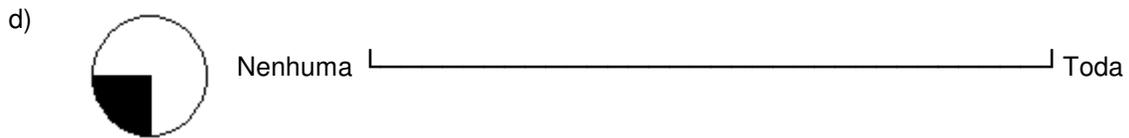
10. Qual das cervejas abaixo é mais doce?

() Malzbier () Bock

11. Marque na linha à direita de cada figura um ponto que indique a proporção da figura que foi coberta de preto. Não é necessário o uso de régua. Use apenas a sua visão. Siga os exemplos a), b) e c):



AGORA VOCÊ !!



OBRIGADO PELA PARTICIPAÇÃO. ENTRAREMOS EM CONTATO EM BREVE.

Anexo 7-2 . Notas do teste de aceitação para construção do modelo

Legendas: **P** = provador / **A** = amostra / **N** = nota de aceitação

1	1	3
1	2	7
1	3	2
1	4	2
1	5	4
1	6	2
1	7	3
1	8	5
1	9	4
1	10	3
1	11	5
1	12	2
1	13	2
1	14	2
1	15	3
1	16	3
1	17	3
2	1	4
2	2	6
2	3	4
2	4	6
2	5	8
2	6	5
2	7	7
2	8	4
2	9	7
2	10	6
2	11	6
2	12	6
2	13	6
2	14	3
2	15	3
2	16	7
2	17	4
3	1	8
3	2	8
3	3	7
3	4	8
3	5	5
3	6	6
3	7	6
3	8	6
3	9	8
3	10	5
3	11	8
3	12	8
3	13	5
3	14	8
3	15	7
3	16	6
3	17	6
4	1	7
4	2	3
4	3	8
4	4	2
4	5	8
4	6	4
4	7	3
4	8	2
4	9	3
4	10	4
4	11	8
4	12	4
4	13	6
4	14	6
4	15	6
4	16	3
4	17	5
5	1	5
5	2	3
5	3	1
5	4	2
5	5	4
5	6	6
5	7	3
5	8	2
5	9	1
5	10	1
5	11	7
5	12	3
5	13	2
5	14	4
5	15	4
5	16	2
5	17	3
6	1	8
6	2	3
6	3	6
6	4	7
6	5	5
6	6	5
6	7	3
6	8	4
6	9	8
6	10	6
6	11	5
6	12	4
6	13	3
6	14	5
6	15	5
6	16	6
6	17	8
7	1	9
7	2	8
7	3	6
7	4	5
7	5	9
7	6	7
7	7	4
7	8	6
7	9	2
7	10	2
7	11	8
7	12	4
7	13	3
7	14	8
7	15	6
7	16	6
7	17	3
8	1	6
8	2	5
8	3	6
8	4	8
8	5	5
8	6	7
8	7	5
8	8	5
8	9	6
8	10	6
8	11	7
8	12	6
8	13	6
8	14	7
8	15	7
8	16	7
8	17	6
9	1	8
9	2	7
9	3	4
9	4	3
9	5	6
9	6	4
9	7	8
9	8	4
9	9	7
9	10	6
9	11	4
9	12	6
9	13	6
9	14	6
9	15	4
9	16	3
9	17	7
10	1	5
10	2	8
10	3	2
10	4	4
10	5	4
10	6	6
10	7	7
10	8	2
10	9	6
10	10	4
10	11	3
10	12	5
10	13	7
10	14	5
10	15	6
10	16	2
10	17	4
11	1	4
11	2	8
11	3	5
11	4	4
11	5	7
11	6	6
11	7	6
11	8	2
11	9	6
11	10	4
11	11	8
11	12	4
11	13	6
11	14	7
11	15	6
11	16	6
11	17	6
12	1	6
12	2	7
12	3	2
12	4	8
12	5	1
12	6	4
12	7	3
12	8	6
12	9	8
12	10	9
12	11	4
12	12	8
12	13	4
12	14	3
12	15	5
12	16	4
12	17	2
13	1	4
13	2	3
13	3	2
13	4	5
13	5	2
13	6	3
13	7	2
13	8	3
13	9	2
13	10	5
13	11	7
13	12	4
13	13	3
13	14	2
13	15	4
13	16	3
13	17	4
14	1	6
14	2	7
14	3	6
14	4	5
14	5	4
14	6	5
14	7	4
14	8	4
14	9	6
14	10	5
14	11	7
14	12	6
14	13	4
14	14	5
14	15	6
14	16	6
14	17	5
15	1	6
15	2	8
15	3	5
15	4	6
15	5	4
15	6	5
15	7	6
15	8	3
15	9	5
15	10	4
15	11	8
15	12	7
15	13	4
15	14	3
15	15	3
15	16	4
15	17	5
16	1	8
16	2	7
16	3	7
16	4	8
16	5	7
16	6	6
16	7	7
16	8	3
16	9	8
16	10	6
16	11	7
16	12	7
16	13	7
16	14	7
16	15	7
16	16	7
16	17	7
17	1	9
17	2	8
17	3	7
17	4	8
17	5	9
17	6	7
17	7	8
17	8	4
17	9	8
17	10	7
17	11	8
17	12	4
17	13	6
17	14	7
17	15	6
17	16	7
17	17	7
18	1	8
18	2	3
18	3	3
18	4	8
18	5	8
18	6	2
18	7	6
18	8	2
18	9	4
18	10	5
18	11	7
18	12	3
18	13	4
18	14	4
18	15	4
18	16	3
18	17	8

Anexo 7-2 - continuação

P	A	N
19	1	7
19	2	7
19	3	3
19	4	6
19	5	8
19	6	8
19	7	8
19	8	4
19	9	7
19	10	4
19	11	5
19	12	2
19	13	3
19	14	7
19	15	4
19	16	6
19	17	7
20	1	4
20	2	6
20	3	4
20	4	4
20	5	7
20	6	6
20	7	2
20	8	2
20	9	3
20	10	6
20	11	8
20	12	2
20	13	7
20	14	4
20	15	2
20	16	4
20	17	3
21	1	8
21	2	9
21	3	3
21	4	7
21	5	8
21	6	8
21	7	7
21	8	3
21	9	8
21	10	3
21	11	8
21	12	4
21	13	6
21	14	4
21	15	7
21	16	3
21	17	6

P	A	N
22	1	5
22	2	4
22	3	4
22	4	4
22	5	7
22	6	4
22	7	4
22	8	6
22	9	8
22	10	7
22	11	6
22	12	6
22	13	6
22	14	5
22	15	4
22	16	7
22	17	6
23	1	8
23	2	7
23	3	4
23	4	4
23	5	7
23	6	6
23	7	3
23	8	4
23	9	4
23	10	5
23	11	7
23	12	8
23	13	8
23	14	8
23	15	4
23	16	6
23	17	7
24	1	6
24	2	7
24	3	3
24	4	6
24	5	7
24	6	4
24	7	6
24	8	4
24	9	3
24	10	6
24	11	7
24	12	4
24	13	3
24	14	4
24	15	6
24	16	4
24	17	3

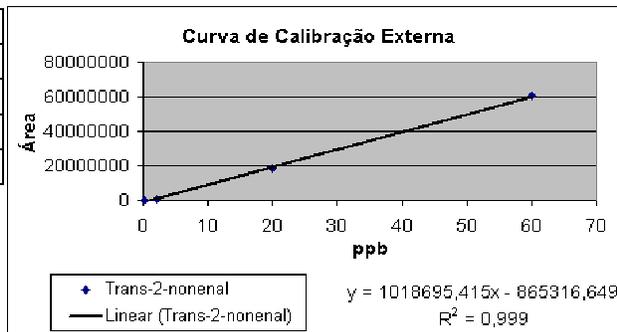
P	A	N
25	1	8
25	2	7
25	3	7
25	4	7
25	5	8
25	6	3
25	7	4
25	8	8
25	9	8
25	10	8
25	11	7
25	12	5
25	13	3
25	14	5
25	15	4
25	16	7
25	17	5
26	1	2
26	2	7
26	3	5
26	4	3
26	5	8
26	6	8
26	7	7
26	8	2
26	9	2
26	10	5
26	11	3
26	12	7
26	13	7
26	14	3
26	15	8
26	16	4
26	17	6
27	1	6
27	2	6
27	3	5
27	4	4
27	5	8
27	6	6
27	7	5
27	8	4
27	9	5
27	10	4
27	11	7
27	12	4
27	13	3
27	14	6
27	15	6
27	16	6
27	17	4

P	A	N
28	1	6
28	2	5
28	3	6
28	4	4
28	5	3
28	6	7
28	7	6
28	8	8
28	9	4
28	10	7
28	11	5
28	12	6
28	13	7
28	14	3
28	15	7
28	16	6
28	17	4
29	1	8
29	2	7
29	3	7
29	4	7
29	5	7
29	6	3
29	7	7
29	8	8
29	9	3
29	10	8
29	11	7
29	12	3
29	13	2
29	14	5
29	15	3
29	16	6
29	17	5
30	1	7
30	2	7
30	3	7
30	4	6
30	5	7
30	6	6
30	7	7
30	8	4
30	9	7
30	10	6
30	11	3
30	12	2
30	13	6
30	14	6
30	15	6
30	16	7
30	17	4

Anexo 7-3. Detalhamento estatístico dos resultados e padronização das determinações de trans-2-nonenal por cromatografia gasosa.

Curva de calibração externa

T2N (ppb)	Extração 1	Extração 2	média
0,2	8586	6065	7325,5
2	1155693	1037752	1096723
20	19336841	17898842	18617842
60	61830787	59276427	60553607



Amostras	área	Área média	S	CV(%)	Ppb (curva)
1	261682				
1	193860	227771	47957,4	21,05509	1,07
2	209315				
2	223933	216624	10336,49	4,771626	1,06
3	167988				
3	158359	163173,5	6808,731	4,172694	1,01
4	194538				
4	188044	191291	4591,951	2,400506	1,04
5	426180				
5	343378	384779	58549,86	15,21649	1,23
6	365104				
6	369368	367236	3015,103	0,821026	1,21
7	223142				
7	180612	201877	30073,25	14,89682	1,05
8	325333				
8	224000	274666,5	71653,25	26,08736	1,12

Repetibilidade e Recuperação: Nível adicionado: 2,0 ppb

n=8					existente			
		média	S	CV (%)	Braexl1	enc - exist	curva ppb	recuperação
rec 8	2661483	2626527,9	106078,8	4,04	186771	2439757	1,9342	96,7%
rec 9	2830756							
rec 10	2770031							
rec 12	2594715							
rec 13	2566765							
rec 14	2683675							
rec 15	2399810							
rec 16	2504988							

limite de detecção =	0,02	ppb	= 3 vezes a amplitude do sinal ruído
limite de quantificação =	0,05	ppb	= 6 vezes a amplitude do sinal ruído