



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DOS ALIMENTOS

Francisca Jamila Correia Louredo

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM CERVEJA
ESTILO CATHARINA SOUR POR ELETROFORESE CAPILAR**

Florianópolis

2023

Francisca Jamila Correia Louredo

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM CERVEJA
ESTILO CATHARINA SOUR POR ELETROFORESE CAPILAR**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Profª. Dra. Roseane Fett

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Louredo, Francisca Jamila Correia

Determinação de ácidos orgânicos alifáticos em cerveja
estilo Catharina Sour por eletroforese capilar /
Francisca Jamila Correia Louredo ; orientador, Roseane
Fett, 2023.

109 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Catharina Sour. 3. Ácidos
orgânicos alifáticos. 4. Eletroforese capilar. 5. Produção
de cervejas . I. Fett, Roseane . II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos
Alimentos. III. Título.

Francisca Jamila Correia Louredo

**DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS EM CERVEJA
ESTILO CATHARINA SOUR POR ELETROFORESE CAPILAR**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. (a) Dr. (a) Carmen Maria Olivera Müller
(CCA/UFSC)

Prof. (a) Dr. (a) Isabela Maia Toaldo Fedrigo
(CCA/UFSC)

Prof. Dr. José Miguel Müller
(CTC/UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em ciências dos alimentos.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. (a) Dr. (a) Roseane Fett

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que tem me fortalecido constantemente; aos meus pais por me tornarem uma pessoa digna e por sempre me proporcionarem a oportunidade de estudar e forçar na minha formação durante todo o curso.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Centro de Ciências Agrárias, pela oportunidade de realização deste curso, também ao CNPq pelo suporte financeiro para a realização deste projeto.

À cervejaria Nefasta pela parceria e permitir a coleta das amostras durante o processamento da Catharina Sour.

Agradeço a minha orientadora Professora Dra. Roseane e a Professora Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa pela oportunidade de trabalhar no seu grupo, pelos ensinamentos, confiança, apoio e pela orientação durante todo o meu mestrado e também a todos os companheiros do Laboratório de Química de Alimentos pela amizade, momentos de descontração, incentivo, atenção e ensinamentos dados durante todo o mestrado.

Um agradecimento especial ao Luciano Gonzaga que com toda dedicação e paciência explicou sobre a técnica de eletroforese capilar e me ajudou a fazer as análises. A Mayara Schulz que me orientou com toda a paciência durante a minha qualificação. E ao Victor Valentim Gomes que foi um presente que Deus me enviou para me ajudar durante o mestrado, agradeço por todas as dicas, ensinamentos e momentos divertidos que passamos juntos durante esse período, desejo tudo de bom na sua vida.

Também agradeço a Professora Dra. Carmen Maria Müller e ao Professor Dr. Jose Miguel Müller pelos ensinamentos sobre cerveja e pela oportunidade de conhecer na prática a produção de Catharina Sour; também aproveito o momento para agradecer ao mestrando Pietro Piccolotto que, junto com o Professor Miguel, me ensinou a produzir cerveja.

E a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para que eu chegasse ao final dessa caminhada, deixo o meu muito obrigada!

RESUMO

A Catharina Sour é uma cerveja de trigo, considerada leve, refrescante, moderadamente ácida e que inclui em sua produção a adição de frutas, nesse estilo as especiarias e ervas também podem ser adicionadas. Essa cerveja é considerada o primeiro estilo genuinamente brasileiro, tendo reconhecimento no mercado de cerveja artesanal nacional e internacional. Entre os diferentes compostos que constitui essa cerveja, os ácidos orgânicos alifáticos (AOA) desempenha um papel importante para as características sensoriais, microbiológica e físico-química dessas bebidas, além de fornecer informações sobre o processo produtivo. Tendo em vista a importância dos ácidos orgânicos para a qualidade das cervejas e o reconhecimento da Catharina Sour como o primeiro estilo brasileiro, o objetivo deste trabalho foi determinar os ácidos orgânicos alifáticos durante as diferentes etapas de produção (mosturação, fermentação láctica e alcoólica, maturação e chope pronto) e em amostras comerciais de cerveja estilo Catharina Sour, visando avaliar esses ácidos como indicadores de caracterização, qualidade e desempenho do processo produtivo. Foram analisados, utilizando eletroforese capilar (CZE-DAD), os ácidos maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, glucônico, glutárico, succínico, acético, oxálico, pirúvico e propiônico em dois processamentos diferentes, o primeiro proveniente de uma cervejaria artesanal da cidade de Florianópolis-SC e o segundo da produção em escala laboratorial do departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, além dessas, também foram analisadas cinco amostras comerciais. Os resultados obtidos demonstraram que os ácidos malônico, cítrico, málico, láctico, succínico e acético foram os ácidos encontrados em todas as cervejas comerciais de Catharina Sour, sendo o ácido láctico, variando de 5826 mg L^{-1} a 8573 mg L^{-1} , o ácido predominante nas amostras analisadas. As análises das etapas de produção indicaram que alguns ácidos têm sua origem no mosto, como o ácido fórmico que apresentou concentração apenas na etapa de mosturação no processamento da cerveja artesanal ($48,5 \text{ mg L}^{-1}$) e na cerveja laboratorial ($104,9 \text{ mg L}^{-1}$). Também foi observado que alguns ácidos são sintetizados durante as etapas de fermentação láctica e alcoólica, como os ácidos málico, láctico, cítrico e succínico. Os dados adquiridos contribuíram para avaliar as mudanças nas concentrações desses ácidos durante o processamento, e forneceram dados sobre a composição do estilo Catharina Sour.

Palavras-chave: Ácidos orgânicos alifáticos. Eletroforese capilar. Qualidade da cerveja. Catharina Sour. Processamento de cerveja.

ABSTRACT

Catharina Sour is a wheat beer, considered light, refreshing, moderately acidic and that includes the addition of fruits in its production, in this style spices and herbs can also be added. This beer is considered the first genuinely Brazilian style, sendo reconhecida no mercado nacional e internacional de cervejas artesanais. Among the different compounds this beer, aliphatic organic acids (AOA) play an important role in the sensory, microbiological and physicochemical characteristics of these beverages, in addition to providing information about the production process. The proposed work consists in the determine the aliphatic organic acids during the different stages of production (wort, lactic and alcoholic fermentation, maturation and draft beer) and in commercial samples of Catharina Sour style beer, aiming to evaluate these acids as indicators of characterization, quality and performance of the production process. Using capillary electrophoresis (CZE DAD), maleic, malonic, fumaric, tartaric, formic, citric, malic, glycolic, lactic, gluconic, glutamic, succinic, acetic, oxalic, pronic and propionic acids were analyzed in two different processes, the first from an artisanal brewery in the city of Florianópolis- SC and the second from the laboratory scale production of the Food Engineering department of the Federal University of Santa Catarina, in addition to these, five commercial samples were also analyzed. The results showed that malonic, citric, malic, lactic, succinic and acetic acids were the acids found in all commercial Catharina Sour beers, as lactic acid the predominant acid in the analyzed samples, ranging from 5826 mg L⁻¹ to 8573 mg L⁻¹. The analyzes of the production stages indicated that some acids have their origin in the wort, such as formic acid that presented concentration only in the mashing stage in the processing of craft beer (48.5 mg L⁻¹) and in the laboratory beer (105 mg L⁻¹). Furthermore, it was also observed that some acids are synthesized during the stages of lactic and alcoholic fermentation, such as malic, lactic, citric and succinic acids. The acquired data contributed to evaluate the changes in the concentrations of these acids during processing, in addition to contributing to the generation of data on the composition of the Catharina Sour style.

Keywords: Aliphatic organic acids. Capillary electrophoresis. Beer quality. Catharina Sour. Brewery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação da estrutura morfológica de um grão de cevada.....	28
Figura 2 – Via das pentoses.....	33
Figura 3 – Seção transversal de um cone de lúpulo.....	35
Figura 4 – Fluxograma do processamento da cerveja estilo Catharina Sour.....	37
Figura 5 – Via glicolítica e a produção de lactato e etanol a partir do piruvato.....	41
Figura 6 – Estrutura química dos principais ácidos orgânicos alifáticos comumente encontrados em cervejas.....	44
Figura 7– Vias metabólicas de produção dos ácidos orgânicos e etanol.....	45
Figura 8 – Concentração de AOA em cervejas tradicionais.....	58
Figura 9 – Representação esquemática de um sistema típico de eletroforese capilar.....	61
Figura 10 – Representação esquemática da separação por eletroforese capilar de zona (A) e a separação baseada na relação carga-tamanho (B).....	62
Figura 11 - Fluxograma da coleta das amostras da cervejaria artesanal.....	66
Figura 12 - Fluxograma da coleta das amostras em escala laboratorial.....	67
Figura 13 – Representação esquemática do preparo da amostra para a análise em CE.....	68
Figura 14 – Eletroferograma da separação dos padrões dos AOA.....	70
Figura 15 - Ácidos orgânicos alifáticos (AOA) presentes nas diferentes etapas da produção artesanal do chope estilo Catharina Sour. Sendo (A) AOA de maiores concentrações nas amostras, (B) AOA de concentrações intermediárias e (C) AOA de menores concentrações nas amostras.....	71
Figura 16 - Via de degradação do ácido tartárico por BAL heterofermentativas.....	72
Figura 17 - Vias de síntese e degradação do ácido cítrico.....	75
Figura 18 - Fermentação malolática.....	76
Figura 19 - Ácidos orgânicos alifáticos (AOA) presentes em amostras do processamento laboratorial da cerveja Catharina Sour. (A) AOA de maiores concentrações nas amostras, (B) AOA de concentrações intermediárias e (C) AOA de menores concentrações nas amostras.	80
Figura 20 - Via do Gluconato.....	83
Figura 21 - Ácidos orgânicos alifáticos (AOA) presentes em amostras comerciais da cerveja estilo Catharina Sour de duas cervejarias distintas (A e B). Gráfico (A) AOA de maiores concentrações nas amostras, (B) AOA de concentrações intermediárias e (C) AOA de menores concentrações nas amostras.....	88

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das cervejas no Brasil.....	24
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais parâmetros da cerveja Catharina Sour.....	26
Tabela 2 – Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo.	35
Tabela 3 – Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes amostras de cerveja.....	50
Tabela 4 – Concentrações dos ácidos orgânicos alifáticos em cada nível da curva de calibração.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBEV	Companhia de bebidas das Américas (Americas' Beverage Company)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOA	Ácido Orgânico Alifático
BGE	Eletrólito de Corrida (Background Electrolyte)
BJCP	Programa de certificação de juiz de cerveja (Beer Judge Certification Program)
CE	Eletroforese Capilar (Capillary Electrophoresis)
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio (Cetyl trimethylammonium bromide)
CZE	Eletroforese Capilar de Zona (Capillary Zone Electrophoresis)
DAD	Detector de Arranjo de Diodos (Diode-Array Detector)
GC-MS	Cromatografia a Gás Acoplada à Espectrometria de Massas (Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
I.S.	Padrão Interno (Internal Standard)
L _{eff}	Comprimento Efetivo (Effective Length)
L _{tot}	Comprimento total (Total Length)
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (Nuclear Magnetic Resonance)
TCA	Ciclo do ácido tricarbóxico (tricarboxylic acid)
TFA	Ácido trifluoroacético (Trifluoroacetic acid)
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris (hydroxymethyl)aminomethane)
UV-Vis	Ultravioleta/Visível (Ultraviolet-Visible)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS	16
1.1.1 Objetivo Geral.....	16
1.1.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 CERVEJA.....	17
2.1.1 Mercado Cervejeiro no Brasil	19
2.1.2 Legislações	21
2.1.3 Classificações.....	22
2.1.4 Cerveja Estilo Catharina Sour	25
2.2 INGREDIENTES	26
2.2.1 Água.....	27
2.2.2 Malte de cevada	27
2.2.3 Malte	28
2.2.4 Leveduras	30
2.2.5 Bactérias acidoláticas (BAL)	30
2.2.6 Lúpulo.....	34
2.2.7 Adjuntos	35
2.3 PRODUÇÃO DA CERVEJA.....	36
2.3.1 Produção do Mosto.....	37
2.3.2 Processo fermentativo	39
2.3.3 Acabamento.....	42
2.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS (AOA) EM CERVEJAS	43
2.4.1 Determinação de ácidos orgânicos alifáticos (AOA) em cervejas	48
2.5 ELETROFORESE CAPILAR.....	61

2.5.1 Contextualização e Instrumentação	61
3 MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS	63
3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES	63
3.3 AMOSTRAGEM.....	65
3.4 PREPARO DE AMOSTRAS	67
3.5 INSTRUMENTAL E CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	68
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1 PRODUÇÃO ARTESANAL DE CERVEJA ESTILO CATHARINA SOUR: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS (AOA).	70
4.2 PRODUÇÃO LABORATORIAL DE CERVEJA ESTILO CATHARINA SOUR: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS.	79
4.3 CERVEJAS COMERCIAIS DE CATHARINA SOUR: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS.....	87
5 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94
APÊNDICE	106

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma das bebidas alcoólicas mais consumidas em todo o mundo. É um produto resultante da fermentação alcoólica do mosto, constituída por água, cevada, lúpulo, fermento e outros cereais (maltados ou não); sendo a composição do mosto, o processo fermentativo e a maturação os principais responsáveis pelas suas características (BRIGGS et al., 2004; BRASIL, 2019).

Além de trazer consigo tradição, sabor e de ser considerada um elemento integrador e de confraternização (MORADO, 2017), a cerveja possui grande relevância para a economia brasileira, sendo o setor cervejeiro responsável por 2,1% do produto interno bruto nacional em 2021, com 1.549 cervejarias espalhadas por todo o país e com produção de 14,3 bilhões de litros/ano, classificando o Brasil em terceiro lugar no ranking mundial da produção de cerveja (BRASIL, 2021; BRANDÃO, 2022). Embora a produção de cerveja artesanal corresponda apenas a 1% do *Market share* nacional, sua produção vem ganhando destaque nos últimos anos (CERVBRASIL, 2021), devido ao novo perfil de consumidor que busca cervejas com novas características, sabores e qualidade diferenciada. Além disso, esses novos consumidores também buscam uma apresentação modernizada do produto, envios de souvenirs e maior interação nas redes sociais com as empresas (SEBRAE, 2016; MATO, 2011).

A cerveja Catharina Sour é um estilo que vem conquistando o paladar dos apreciadores de cervejas artesanais. Ela foi idealizada em 2015 por cervejarias catarinenses que buscavam desenvolver um novo estilo de cerveja com características diferenciadas das que estavam disponíveis no mercado (CATHARINA SOUR, 2021). Esses mestres cervejeiros desenvolveram uma cerveja de trigo, leve, refrescante, moderadamente ácida e com adição frutas, além de especiarias, ervas e vegetais que podem complementar a receita. A Catharina Sour foi reconhecida pela *Beer Judge Certification Program* (BJCP) como sendo a primeira cerveja tipicamente brasileira a obter reconhecimento internacional e ser incluída no guia de estilo em 2021 (BJCP, 2021).

A composição da cerveja tem grande influência na sua qualidade e nas suas características físico-químicas e sensoriais. São mais de 3000 diferentes compostos que podem ser encontrados na cerveja, incluindo carboidratos, proteínas, aminoácidos, minerais, compostos fenólicos e ácidos orgânicos, os quais variam de acordo com as matérias-primas utilizadas (ANDERSON et al., 2019).

Os ácidos orgânicos alifáticos mais encontrados nas cervejas são os ácidos acético, láctico, cítrico, málico, pirúvico e succínico, suas concentrações podem variar dependendo da matéria-prima utilizada na elaboração do mosto, do processo fermentativo e da etapa de maturação da cerveja (MONTANARI et al., 1999; BRIGGS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2010; HONG; FANG, 2015; ANDERSON et al., 2019; KOZAKI et al., 2019). Esses compostos contribuem para as características de sabor e aroma, além de desempenhar um papel importante na estabilidade microbiológica e físico-química dessas bebidas, o que contribui para a sua qualidade, vida de prateleira e aceitabilidade. Também fornecem informações sobre o processo fermentativo e ainda podem contribuir para a diferenciação, identificação de origem e de adulterações em cervejas (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005; MATO et al., 2006; SANTALAD et al., 2007; RODRIGUES et al., 2010; LIU et al., 2017; ANDERSON et al., 2019).

Apesar do visível reconhecimento da Catharina Sour para o mercado de cerveja artesanal nacional e internacional, e da importância dos ácidos orgânicos para a qualidade e caracterização desse estilo de cerveja, até o presente momento não foram publicados estudos que determinaram esses compostos durante as etapas de processamento. Diante disso, este projeto justifica-se pela demanda em avaliar ácidos orgânicos em cervejas Catharina Sour como indicadores de caracterização, qualidade e desempenho do processo produtivo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Determinar ácidos orgânicos alifáticos durante o processamento e em amostras comerciais de cerveja Catharina Sour utilizando eletroforese capilar.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar possíveis alterações no perfil de ácidos orgânicos alifáticos durante o processamento da cerveja Catharina Sour;
- Avaliar a importância desses ácidos para a caracterização desse estilo de cerveja;
- Analisar os ácidos orgânicos alifáticos (maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, glucônico, glutárico, succínico, acético e propiônico) em amostras de cerveja Catharina Sour comercializadas em Florianópolis-SC e em amostras coletadas de diferentes etapas do processamento (mosturação, fermentação e maturação).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CERVEJA

A produção da cerveja está relacionada com o fim da vida nômade e o início do cultivo de grãos de cereais, por volta de 8.000 a.C. Nesse período, essa produção era realizada principalmente pelas mulheres das regiões da Mesopotâmia, vila neolítica de Jiahu no norte da China e Egito. (AQUARONE et al., 2001; OETTERER; ALCARDE, 2006).

As primeiras cervejas eram produzidas com os mesmos ingredientes usados para produzir pães: grãos de cereais (cevada, trigo, arroz e aveia), água e leveduras selvagens que ainda não se tinha conhecimento da sua participação, nesse período também não se conhecia o lúpulo e, desse modo, a cerveja era conhecida como “pão líquido”. O processo produtivo dessa cerveja era iniciado com a germinação dos grãos, os quais eram deixados de molho, favorecendo a conversão enzimática do amido em mono e dissacarídeos, na sequência esses grãos eram secos para interromper o processo enzimático e o produto obtido era o cereal maltado. Após a secagem os grãos eram moídos, adicionava-se água e eram deixados para fermentar até a obtenção de uma cerveja ácida, sem padrão de cor, opaca e que apresentava diferentes aromas. Como essa cerveja era consumida ainda com os resíduos de fermentação, era considerada como alimento, pois, como mencionado, continha os mesmos ingredientes presentes no pão (IIMURE; SATO, 2013; BRIGGS et al., 2004; MORADO, 2017).

Os egípcios produziam uma cerveja a partir de malte de *milo* (um sorgo parecido com milho) chamada de *Bouza*, que ainda é produzido na região. Esta civilização foi uma das principais responsáveis pela popularização da cerveja pelo mundo e há registros da sua utilização como moeda de troca, tanto no Egito quanto na Mesopotâmia. Além disso, os egípcios produziam vários tipos de cerveja com o nome de *zythum*, que era considerada uma bebida nacional e era utilizada nos ritos religiosos, sendo as mais suaves distribuídas aos pobres e as aromatizadas com gengibre, tâmara e mel reservadas aos nobres (BAMFORTH, 2009; MORADO, 2017; HARRISON; ALBANESE, 2017).

Quando a cerveja chegou à Gália, atual França, e na Galícia, atual Espanha, recebeu o nome *cerevisia* ou *cervisia*, em homenagem a *Ceres*, a deusa da colheita, fertilidade e da força. O nome cerveja se popularizou e diferentemente do nome *zythum* do Egito, é utilizado até a atualidade (BAMFORTH, 2009).

Na Idade Média, as primeiras iniciativas de produção sistematizada de cerveja aconteceram nos mosteiros, nas Abadias, que tinham amplas instalações para a fabricação de cerveja. Nesse período essas cervejas eram produzidas por monges, que praticavam o jejum de alimentos sólidos e usavam a cerveja como fonte de alimento nesse período de jejum. Entre os séculos VIII e XVI, a cerveja transformou-se e difundiu-se junto com o desenvolvimento das vilas, dando início a criação de negócios especializados em produção de cervejas, que antes era basicamente limitado às famílias (mulheres) e mosteiros. Nesse período também apareceram os primeiros especialistas no cultivo de grãos e na produção de cerveja (FERREIRA, 2011; MORADO, 2017).

Os povos de origem germânica foram uns dos primeiros a empregar o lúpulo na cerveja e, posteriormente, devido ao fato de que eram utilizados diversos ingredientes na produção, o Duque alemão Guilherme IV, da Bavária, criou a primeira lei para a produção de cerveja, a lei da pureza alemã de 1516 (*Reinheitsgebot*). Com essa lei só era permitido a utilização de cevada, lúpulo e água (WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Posteriormente, com a descoberta do processo fermentativo, em 1815, pelo químico francês Gay-Lussac, e com os estudos de Louis Pasteur, em 1959, a levedura foi adicionada à lista de ingredientes permitidos para a produção de cerveja (OETTERER; ALCARDE, 2006).

Em 1870, devido aos altos preços da cevada, cervejeiros americanos começaram a utilizar outros cereais (milho, trigo e arroz) para a substituição total ou parcial do malte da cevada, essa substituição tinha como objetivo a redução dos custos de produção da cerveja, contudo, a lei da pureza alemã não permitia a utilização desses ingredientes, o que começou a afastar os cervejeiros americanos da escola cervejeira alemã. A partir disso, outros países também começaram a criar suas próprias leis de produção e desenvolver novas técnicas e receitas, dando início às escolas cervejeiras. Atualmente há quatro escolas cervejeira, a alemã, a inglesa, a americana e a belga, cada uma com suas características e personalidades específicas (BRIGGS et al., 2004; MORADO, 2017).

Essa busca por novos ingredientes e a necessidade de facilitar o processo produtivo levou à modernização na produção da cerveja ao logo dos anos. Um desses avanços foi a utilização do coque para secagem do malte, sem torrá-los, o que resultou em cervejas mais claras, conhecida como *Pale Ale*. O aumento do preço devido a esse processo fez com que essa cerveja fosse consumida apenas pelas pessoas com maior poder aquisitivo da época e,

devido a isso, a coloração da cerveja passou a ser um fator importante na escolha, pois essa bebida passou a ser associada à nobreza da época (MORADO, 2017).

Nos anos seguintes, as empresas buscaram modernizar a produção controlando o processo fermentativo, além de estudos sobre novas técnicas de secagem do malte, entretanto mantendo a coloração clara. Nos séculos XX e XXI foram realizados estudos para melhoramento genético dos grãos, com os quais foram obtidas variantes da cevada, como a *Maris Otter*, desenvolvido no Reino Unido nos anos 70 (MORADO, 2017; WINDESA, 2020).

No Brasil, os primeiros registros da cerveja são do “Jornal do Commercio”, do Rio de Janeiro, em 1836, embora nessa época as cervejas fossem importadas de países europeus. Em 1888 foi fundada a primeira cervejeira no Brasil, no Rio de Janeiro, a Manufatura de Cerveja Brahma Villigier e Cia e em 1891 foi fundada a Companhia Antártica Paulista, na cidade de São Paulo. Em 1967 foi fundada a Skol, em 1980 a Kaiser e em 1999 surge a AmBev (Companhia de Bebidas das Américas) a partir de uma fusão entre a Companhia Antártica Paulista e a Companhia Cervejaria Brahma. (MORADO, 2017; CERVBRA, 2021).

Durante as décadas de 1960 e 1970, Fritz Maytag iniciou o movimento conhecido como “faça você mesmo”, nos Estados Unidos, que incentivava a produção artesanal de cerveja e, posteriormente, o surgimento de diversas microcervejarias e da Escola Cervejeira Americana. No Brasil, em 1980, surgiram as primeiras microcervejarias e em 1995 surgiu o primeiro bar-cervejaria do Brasil com forte influência das cervejarias artesanais americanas. Em 2006, deu-se a criação da primeira associação de cervejeiros artesanais, no Rio de Janeiro, com a fundação da Associação de Cervejeiros Artesanais do Brasil (ACervA Brasil), uma associação sem fins lucrativos, criada para divulgar e fomentar a cultura cervejeira e o hobby de fazer cerveja artesanal (MORADO, 2017).

2.1.1 Mercado Cervejeiro no Brasil

O Brasil ocupa o terceiro lugar no ranking mundial da produção de cerveja, ficando atrás apenas da China com cerca de 48 bilhões de litros e dos Estados Unidos com aproximadamente 22,5 bilhões (BRANDÃO, 2022). Atualmente o país possui 1.549 cervejarias espalhadas por todo o território nacional, 35.741 produtos registrados no

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), produção de 14,3 bilhões de litros de cerveja e é responsável por mais de 2 milhões de empregos, gerados de forma direta ou indireta, demonstrando a extensa cadeia produtiva que o segmento representa no país (BRASIL, 2021). Em 2021 esse setor foi responsável por 2,1% do produto interno bruto nacional (PIB) e faturou R\$ 208,8 bilhões, sendo US\$ 131,5 milhões oriundos da exportação que atualmente é um mercado em expansão. Esses dados demonstram a elevada relevância que o setor representa para a economia brasileira, além de evidenciar a expectativa do aumento da exportação que ainda está centralizada nos países da América do Sul (99%), sendo o Paraguai o principal destino de 65,6% de toda a cerveja exportada, seguido por Bolívia (11,4%), Chile (8,8), Argentina (6,4%), Uruguai (5,7%) e outros (2,1%) (BRASIL, 2021; CERVBRA, 2021; BRANDÃO, 2022; MAFRA, 2022).

A região sudeste possui o maior número de cervejarias registradas com 691, seguido pela região Sul com 638, totalizando 1.329 cervejarias nessas duas regiões, o que corresponde a 85,8% das cervejarias do país, além disso, essas regiões ainda são responsáveis por 91,8% de todos os produtos registrados no MAPA, com destaque para o Estado de São Paulo, em primeiro lugar, com 340 cervejarias registradas e com 10,104 registros de produtos para cervejaria (crescimento médio anual de 29,2% nos últimos cinco anos), contudo, esse Estado ocupa o sexto lugar na classificação de densidade cervejeira por unidade da Federação (Hab/Cerv) com um estabelecimento para cada 137.203 habitantes. O Estado de Santa Catarina está em terceiro lugar com 195 cervejarias registradas, sendo 20 novos registros em 2021 (crescimento médio anual de 26,3% nos últimos cinco anos) e com 4.372 produtos registrados. O Estado ainda ocupa o primeiro lugar na classificação de densidade cervejeira com 37.633, sendo o Estado mais próximo do nacional, que corresponde a uma cervejaria registrada para cada 137.713 habitantes (BRASIL, 2021).

Apesar do Nordeste (7,2%), Centro-Oeste (5,1%) e Norte (1,9%) não apresentarem tanto destaque na produção de cerveja como as regiões Sul e Sudeste (85,8%), desde 2020 o Nordeste apresentou crescimento médio de 41,4% e o Centro-Oeste de 22,8%, demonstrando avanço na instalação de novas cervejarias. A região Norte também apresentou crescimento com a abertura da primeira cervejaria no Acre em 2020, ano no qual todos os Estados brasileiros passaram a ter no mínimo uma cervejaria com o registro no MAPA, além disso, em 2021 ocorreu um grande aumento da produção no Norte do país com a abertura de 5 novas fábricas, apresentando um crescimento de 20,8% em relação ao ano de 2020 (BRASIL, 2021).

Até o presente momento, o MAPA não apresenta uma definição diferenciada para as microcervejarias, sendo essas sujeitas as mesmas regras e procedimentos de registro das grandes cervejarias, com algumas diferenciações em relação ao zoneamento, licenciamento e tributações (BRASIL, 2021; MAFRA, 2022). Entretanto, diferentemente das grandes indústrias de produção, as microcervejarias representam apenas 1% da produção nacional, contudo, esse segmento vem crescendo nos últimos anos e atualmente apresenta grande perspectiva de expansão devido ao novo perfil de consumidor, que busca cervejas com novas características, sabores e qualidade diferenciada (SEBRAE, 2016; CERVBRASIL, 2021).

2.1.2 Legislações

A legislação brasileira para a produção e comercialização de cerveja é regida pela lei nº 8.918, de 14 de julho de 1994, que estabelece a obrigatoriedade do registro, da padronização, da classificação, da inspeção e da fiscalização da produção e comércio de bebidas em todo o território nacional, essa lei é regulamentada pelo decreto nº 6.871, de 4 de julho de 2009.

O decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019, no seu Art. 36, define a cerveja como “uma bebida resultante da fermentação alcoólica do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, submetido previamente a um processo de cocção adicionado de lúpulo ou extrato de lúpulo” (BRASIL, 2019). Esse novo decreto é um anexo do decreto nº 6.871, de 4 de julho de 2009, com algumas alterações como a possibilidade de adição de ingredientes de origem animal, como o mel, o leite e outros ingredientes. Essa mudança agradou as cervejarias, especialmente as artesanais, visto que uma das principais características do setor cervejeiro é a criatividade.

Existe no Brasil outras legislações que vigoram no setor, como a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019 (MAPA), que estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria (BRASIL, 2019) e a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 64 e 65, de 29 de novembro de 2011 (ANVISA), que estabelecem, respectivamente, os coadjuvantes (agente de clarificação/filtração/controle de microrganismo, catalisador, detergente, fermento biológico, gás propelente, gás para embalagens, nutriente para leveduras e resina de troca iônica/ membrana/ peneira molecular) (BRASIL, 2011a) e os aditivos alimentícios (acidulantes/regulador de acidez, antiespumante,

antioxidante, aromatizante, corante e estabilizante) permitidos para a elaboração da cerveja (BRASIL, 2011b).

Além das legislações nacionais, o Estado de Santa Catarina também sancionou algumas leis estaduais para o setor cervejeiro. A lei n° 16.880 de 18 de janeiro de 2016 dispõe sobre a criação da rota das cervejas de Santa Catarina, visando incentivar a cultura e a produção da cerveja artesanal catarinense por meio das microcervejarias artesanais, micromaltarias, bem como dos produtores de insumos e equipamentos cervejeiros, instituições de ensino cervejeiro e produtores caseiros de cerveja (SANTA CATARINA, 2016), essa lei foi alterada pela lei n° 17.467 de 10 de janeiro de 2018, que denomina como Vale das Cervejas a região formada pelos Municípios que compõem a Associação dos Municípios do Médio Vale do Itajaí (AMMVI) (SANTA CATARINA, 2017). Além dessas, a lei n° 13.418, de 09 de março de 2017, foi sancionada para conferir ao município de Blumenau, o título de Capital Nacional da Cerveja.

Outra importante lei para as cervejarias artesanais catarinenses é a lei n° 18.050, de 29 de dezembro de 2020, na qual é estabelecida a comercialização de no mínimo 20% de cerveja artesanal produzida em território catarinense nos eventos realizados com recursos públicos, quando houver comercialização de cerveja, visando incentivar a produção no Estado (SANTA CATARINA, 2020).

2.1.3 Classificações

Segundo Morado (2017), a classificação da cerveja segundo um critério ou conjunto de critérios é uma tarefa difícil, visto que essa bebida pode ser classificada segundo a cor, ingredientes, teor alcoólico, origem do estilo, método de produção, tipo de fermentação, teor de malte, entre outros.

De acordo com a fermentação, as cervejas podem ser classificadas em: Alta fermentação, baixa fermentação, fermentação espontânea e fermentação mista (BRIGGS et al., 2004; BAMFORTH, 2009; MORADO, 2017; BJCP, 2021). Na fermentação mista são realizados dois ou mais processos fermentativos, como no caso da cerveja Catharina Sour, em que ocorre a fermentação alcoólica e láctica (BJCP, 2021). As cervejas de alta fermentação ou de superfície são as cervejas do tipo *Ale*, levedura *Saccharomyces cerevisiae*, atuando no topo do tanque fermentador, com temperaturas entre 15 e 24 °C. O processo pode levar de 2 a 5

dias, produzindo, normalmente, uma cerveja clara, com sabor pronunciado de lúpulo, ligeiramente ácida, com pH de cerca de 3,8 a 4,3 e com teor alcoólico entre 4 e 8% (COOTE; KIRSOP, 1974; SIQUEIRA, BOLINI E MACEDO, 2008; MERTENS et al., 2015)

As cervejas de baixa fermentação são as do tipo *Lager* que foram descobertas devido à necessidade de se produzir no inverno e guardar as cervejas até o verão europeu. São produzidas com cepas de *Saccharomyces carlsbergensis (pastorianus)* em temperaturas entre 6 e 15 °C durante um período de 6 a 14 dias. A fermentação é do tipo profunda, pois a levedura sedimenta mais facilmente, atuando na parte inferior do tanque fermentador. Essas cervejas tendem a ser douradas, leves, brilhantes e com teor alcoólico entre 4 e 5% (ARAUJO, 2003; SANCHEZ et al., 2012; MORADO, 2017).

As cervejas de fermentação espontânea, como as *Lambics*, utilizam leveduras selvagens, normalmente dos gêneros *Brettanomyces* e da espécie *Torulaspora delbrueckii*. A fermentação normalmente concentra-se na superfície devido à utilização de temperatura ambiente, e todo o processo demora cerca de 1 a 2 anos. Durante essa fermentação também podem ser utilizadas frutas que irão contribuir para aumentar a acidez, principalmente devido a diversidade microbiológica presente nesse tipo de fermentação (SNAUWAERT et al., 2016; MORADO, 2017).

A atual legislação brasileira classifica a cerveja de acordo com o teor alcoólico e proporção de matérias-primas, como demonstrado no Quadro 1. Além disso, expressões específicas são empregadas de acordo com as características específicas de alguns produtos (BRASIL, 2019).

Quadro 1 – Classificação das cervejas no Brasil.

Classificação	Teor alcoólico (% V/V)
Cerveja sem álcool	$\leq 0,5\%$
Cerveja com baixo teor alcoólico	$> 0,5\%$ e $< 2,0\%$
Cerveja	$> 2,0\%$
	Proporção de matérias-primas
Cerveja	$\geq 55\%$ de cevada malteada e no máximo 45% de adjuntos cervejeiros
Cerveja 100% malte ou cerveja puro malte	Quando elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém exclusivamente de cevada malteada ou de extrato de malte
Cerveja 100% malte ou cerveja puro malte mais o nome do cereal malteado	Quando elaborada a partir de um mosto cujo extrato primitivo provém exclusivamente de outro cereal malteado
Cerveja mais nome do cereal majoritário (malteado ou não)	No máximo de 80% de adjuntos cervejeiros e o mínimo de 20% em peso de malte de cevada, ou malte de (nome do cereal utilizado)

Fonte: Brasil (2019).

O anterior decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009 apresentava, em seu artigo 38, uma classificação mais ampla para a cerveja, a classificando em relação ao extrato primitivo (cerveja comum, cerveja extra e cerveja forte), a cor (cerveja clara, escura, colorida) e fermentação, além desse artigo, o 39 que trazia a classificação em relação ao tipo (*Pilsen, Export, Lager, Dortmunder, Munchen, Bock, Malzbier, Ale, Stout, Porter, Weissbier, etc.*) também foi revogado pelo decreto nº 9.902, de 8 de julho de 2019 .

Além da classificação apresentada anteriormente, a *Beer Judge Certification Program* (BJCP), uma organização sem fins lucrativos fundada no Colorado (Estados Unidos) em 1985, possui um guia de classificação de estilos conhecido mundialmente e que sempre está se atualizando. A BJCP afirma que essa atualização é importante devido às novas tecnologias que são desenvolvidas, a adição de novos ingredientes que criam novos estilos e,

também, devido às mudanças na legislação de cada país e no paladar do consumidor que incentivam a busca por novos sabores e estilos (BJCP, 2021).

Segundo esse guia, a cerveja pode ser classificada segundo o processo fermentativo (*Ale, Lage*), segundo sua origem geográfica, tipo de cereal e malte utilizado, adição de frutas e/ou ervas e especiarias, envelhecimento em barris de madeira, entre outros tipos de cervejas que foram distribuídos em 121 estilos divididos nos 35 grupos apresentados no guia. Além disso, esse guia ainda apresenta uma breve descrição das principais características (aroma, sabor, aparência, ingredientes, comparação com outros estilo e exemplos comerciais) de cada estilo apresentado (MORADO, 2017; BJCP, 2021).

2.1.4 Cerveja Estilo Catharina Sour

A Catharina Sour é um estilo de cerveja que tem origem em Santa Catarina, foi idealizada em 2015 por mestres cervejeiros que buscavam desenvolver um novo tipo de cerveja com características próximas da *Berliner Weisse*, uma cerveja de trigo alemã, mas com a adição de frutas e/ou especiarias, conferindo características diferenciadas das que eram produzidas pelas grandes indústrias na época (LAPOLLI, 2019).

O nome foi idealizado pela cervejaria Blumenau em parceria com a *The Liffey Brew pub*, que batizaram a cerveja com o nome de Catharina Sour: a Coroa Real, sendo a primeira cerveja com adição de abacaxi e hortelã. Em 2016, após o Festival Brasileiro da Cerveja, em Blumenau, Santa Catarina, essa cerveja se popularizou e esses mestres cervejeiros, em parceria com a Associação das Micros Cervejarias de Santa Catarina (ACASC), se uniram para promover essa cerveja para outros Estados do Brasil. Em 2018, a cerveja foi provisoriamente reconhecida como um novo estilo pelo *Beer Judge Certification Program* (BJCP) obtendo o reconhecimento nacional e internacional e, em 2021, foi oficialmente reconhecida pelo BJCP como sendo a primeira cerveja tipicamente brasileira, entrando oficialmente para o guia de estilo (CATHARINA SOUR, 2021; BJCP, 2021).

Segundo o BJCP (2021), a Catharina Sour é um estilo de cerveja de trigo que vem conquistando o paladar dos apreciadores de cervejas artesanais, é uma bebida leve, refrescante, muitas vezes apresentando um perfil tropical e com teor alcoólico entre 4% a 5,5%. Esse teor alcoólico pode a diferenciar de outros estilos de cervejas de trigo, como a *Berliner Weisse* que apresenta teor alcoólico em torno de 3,8%. Além disso, também

apresenta como matéria-prima a adição de frutas, o que a deixa com uma acidez moderada, o que pode contribuir para diferenciá-la das *Lambic* que apresentam um perfil mais ácido e das *Fruit Beer* que apresentam uma característica menos ácida e até mais adocicada do que a Catharina Sour (BJCP, 2021; STRONG, 2022).

As características sensoriais de cor, sabor e aroma dessa cerveja podem variar dependendo da fruta e/ou ervas e especiarias adicionadas. Normalmente são utilizadas frutas típicas de cada região, o que abrange uma grande variedade devido à biodiversidade brasileira, fazendo desse estilo de cerveja único e diferenciado, pois a adição desses ingredientes contribui para as características sensoriais dessa cerveja, além de contribuir para a acidez, teor alcoólico e frescor da bebida. (ALVES, 2019; STRONG, 2022). Na Tabela 1 estão descritos os principais parâmetros da cerveja Catharina Sour.

Tabela 1 - Principais parâmetros da cerveja Catharina Sour.

Parâmetros	Valores
Densidade original (OG)	1,039 - 1,048
Unidade internacional de amargor (IBU)	2 – 8
Densidade final (FG)	1.004 – 1.012
Teor de álcool (ABV)	4,0 - 5,5 %
Cor (SRM)	2 – 6

Fonte: BJCP (2021).

2.2 INGREDIENTES

Segundo a Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019, os principais ingredientes da cerveja são: água, cereais maltados, fermento e lúpulo. A legislação também permite a adição de ingredientes opcionais de origem animal e vegetal, além dos adjuntos cervejeiros, os quais podem substituir no máximo 45%, em peso em relação ao extrato primitivo, o malte ou o extrato de malte na elaboração do mosto cervejeiro (BRASIL, 2019).

Compreender como a composição da matéria-prima utilizada na produção da cerveja pode influenciar o processamento e até a qualidade da cerveja (BETTENHAUSEN et al., 2018), torna o processo de escolha desses ingredientes uma etapa fundamental no processo de produção. Desse modo, a seguir, são abordados os principais ingredientes empregados na produção da cerveja.

2.2.1 Água

A água é um insumo importante para a qualidade da cerveja (STEWART, 2016), pois corresponde a cerca de 90% da composição da bebida, sendo as suas características físico-químicas e microbiológicas de fundamental importância para a obtenção de uma cerveja de qualidade (ANDERSON et al., 2019).

Além dos parâmetros de qualidade exigidos pelo Ministério da Saúde para a água potável (BRASIL, 2011c), é necessário o controle do pH da água que será utilizada na elaboração do mosto, pois o pH inadequado pode influenciar na atividade enzimática, solubilização de compostos, cor, coagulação dos componentes proteicos e também nas características do produto final (ROSA, AFONSO, 2015).

A dureza da água (quantidade de íons de cálcio e magnésio) é outro fator determinante, pois influencia nas reações durante o processamento e nas características finais da cerveja. A água dura (maior teor de minerais) produz cervejas mais escuras e ácidas, enquanto a água mole (menor concentração de minerais) irá produzir cervejas mais claras, como a *Pilsen* (AQUARONE et al., 2001). Além disso, a presença de sódio e cloreto na água pode deixar o malte mais doce e o sulfeto acentuar o sabor do lúpulo (ANDERSON et al., 2019).

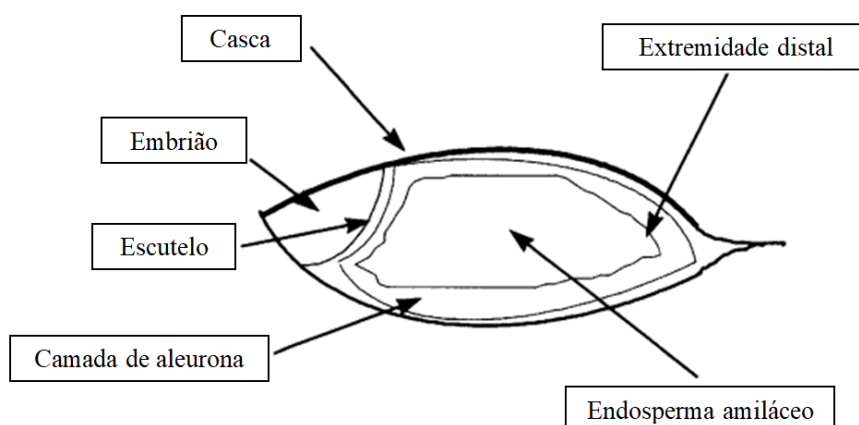
A região em que está localizada a cervejaria irá influenciar no seu abastecimento de água e conseqüentemente nas características dessa cerveja, contudo, atualmente, esse fator não é mais determinante para a escolha do local da cervejaria, pois as indústrias realizam o tratamento da água para atingir as características desejadas (BRIGGS et al., 2004; ANDERSON et al., 2019).

2.2.2 Malte de cevada

Segundo o decreto nº 9.902, de 2009, a cerveja é resultante do mosto de cevada malteada ou de extrato de malte, fazendo da cevada um ingrediente obrigatório para a produção dessa bebida. Ainda que a IN nº 65, de 2019, permita a adição de adjuntos cervejeiros em até 45%, nos casos das cervejas comuns e em até 80% nas cervejas com adição de outros cereais (trigo, aveia, arroz e milho) que são majoritários e darão o nome a essa cerveja, a cevada ainda consta como ingrediente obrigatório para a produção nesses dois casos (BRASIL, 2019).

A cevada (*Hordeum vulgare*) é uma gramínea anual cultivada em todo o mundo, exceto nos trópicos (IIMURE; SATO, 2013). O grão é formado por uma cariopse, revestida por uma casca, constituída por farelo, camada de aleurona (revestimento do endosperma), endosperma e embrião (Figura 1) (BAXTER; HUGHES, 2001). As flores estão dispostas em espigas cujos grãos podem estar alinhados em duas ou seis fileiras (BRIGGS et al., 2004), a cevada de duas fileiras é conhecida como a cevada cervejeira devido ao seu maior teor de amido, enzimas e proteínas que irão contribuir para a formação de espuma, corpo e turbidez da cerveja, esses grãos também apresentam baixo teor lipídico, contribuindo para a estabilidade do sabor e espuma da bebida (ROSA, AFONSO, 2014; MALLETT, 2014).

Figura 1- Representação da estrutura morfológica de um grão de cevada.



Fonte: Adaptado de Baxter; Hughes (2001).

2.2.3 Malte

O malte é definido como sendo o produto da germinação de cereais como a cevada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*), aveia (*Avena sativum*), centeio (*Secale cereale*) e sorgo (*Sorghum vulgare*) (BRIGGS et al., 2004). Esse processo tem como principal objetivo elevar o teor de enzimas (proteases, amilases, glucanases etc.) no grão (HARRISON; ALBANESE, 2017), que irão quebrar as macromoléculas em moléculas menores para serem utilizadas durante o processamento da bebida (AQUARONE et al., 2001; MALLETT, 2014).

De forma sucinta, o processo de maltagem envolve as seguintes etapas: Preparo dos grãos: nessa etapa ocorre a seleção e classificação (cor, tamanho, grãos avariados etc.) dos grãos a fim de garantir a remoção de impurezas (BRIGGS et al., 2004) e obter menor

porcentagem de grãos quebrados, além de selecionar os grãos que apresentem alto teor de amido e proteína (RODRIGUES et al., 2015).

Maceração: nessa etapa, os grãos dos cereais são umedecidos até aumentar o teor de água de 12% para 45%, o que leva em torno de 48 horas (BAXTER; HUGHES, 2001). Essa água absorvida migra para o embrião do grão, inicialmente hidratando a camada da aleurona e, em seguida, o endosperma, esse tempo de hidratação depender do tipo de cereal utilizado e suas características (RODRIGUES et al., 2015). Nessa etapa também é importante o controle da temperatura, visto que temperaturas elevadas podem danificar o grão e aumentar a proliferação microbiana indesejada. Assim, a temperatura deve ser mantida entorno de 12 °C para grãos imaturos e entre 16 e 18 °C para os demais (BRIGGS et al., 2004).

Germinação: nessa etapa os grãos sofrem modificações físicas, formação da radícula (precursora da raiz) e da acrospira (precursora da primeira folha) (BRIGGS et al., 2004; MORADO, 2017). Durante a hidratação, ocorre a produção do ácido giberélico (fitohormônio) que induz as células da camada de aleurona a produzir enzimas hidrolíticas que irão causar alterações no endosperma, tornando-o mais solúvel e liberando moléculas menores (BAMFORTH, 2009; RODRIGUES et al., 2015). As principais enzimas envolvidas nessa etapa são as amilolíticas (α -amilases e β -amilases) que quebram o amido, as proteolíticas que hidrolisam as proteínas, deixando-as mais solúveis, e as celulolíticas que rompem a parede celular (BAXTER; HUGHES, 2001; HARRISON; ALBANESE, 2017).

Secagem: nessa etapa a germinação é interrompida, ocorre a redução do teor de água entorno de 3 a 5% para maltes claros e 1 a 4% para os escuros, eliminação da radícula e produção de compostos da reação de *Malliard*, como maltoxazina, maltol, isomaltol e etil maltol (BETTENHAUSEN et al., 2018), os quais contribuem para a produção de aroma e formação de pigmentos (IIMURE; SATO, 2013), além disso, a secagem contribui para a conservação e armazenamento do malte por reduzir o teor de água no grão (MALLETT, 2014).

Os principais tipos de malte produzido são o *Pilsen* (típico das cervejas *Lager*), *Pale Ale* (típico das cervejas *Ale*), caramelo (típico das cervejas *Oktoberfest* e *Bock*), chocolate (típico das cervejas *Bocks*, *Porter* e *Brown Ale*), defumado (típico das cervejas *Scottish Ale*, *Old Ale*, *Smoked*, *Rauchbier* e *Stout*), escuros (típico das cervejas *Red Ale* e *Stout*) e os maltes oriundos do centeio, trigo e aveia (MORADO, 2017; BJCP, 2021).

2.2.4 Leveduras

As leveduras são microrganismos eucarióticos, predominantemente unicelulares e pertencem ao Reino Fungi (AQUARONE et al., 2001; OETTERER; ALCARDE, 2006), esses microrganismos são capazes de converter os açúcares fermentescíveis presente no mosto em etanol, dióxido de carbono e outros metabólitos menores (BLEOANCA, 2013; ANDERSON et al., 2019) que contribuem para a formação do aroma e sabor, como os ácidos orgânicos (lático, acético, málico, cítrico, pirúvico e succínico), ésteres (acetato de etila, acetato de isoamila e acetato de n-propila), álcoois superiores (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol e 3-metil-1-butanol), aldeídos, entre outros (ROSA, AFONSO, 2014).

Para a produção da cerveja, a levedura deve apresentar características adequadas de floculação, sedimentação, estabilidade genética, tolerância osmótica (osmorregulação), baixa produção de glicerol, alta eficiência na produção de etanol, boa resistência térmica e a capacidade de produzir ésteres, álcoois superiores e compostos que irão contribuir para o sabor, cor e aroma dessas bebidas (AQUARONE et al., 2001; COCOLIN, 2012).

As leveduras mais utilizadas em cervejaria são a *Saccharomyces cerevisiae* e a *Saccharomyces pastorianus*. A *Saccharomyces cerevisiae* (alta fermentação) possui grande tolerância ao álcool, fermenta em temperaturas entre 15 e 24 °C e em pH entre 3,8 a 4,3. As cervejas produzidas com essa levedura vão apresentar as características típicas das cervejas do tipo *Ale*. Em contrapartida, a *Saccharomyces pastorianus* (baixa fermentação) apresenta menor resistência ao álcool, fermenta em temperaturas entre 6 e 15 °C, em pH entre 4,1 e 4,2 e são típicas das cervejas do tipo *Lager* (COOTE; KIRSOP, 1974; OETTERER; ALCARDE, 2006; COCOLIN, 2012; BLEOANCA, 2013; BORTOLI, 2013; HARRISON; ALBANESE, 2017; ANDERSON et al., 2019).

2.2.5 Bactérias acidoláticas (BAL)

Durante a elaboração das cervejas *sours* é realizada uma etapa de fermentação do mosto pela ação de bactérias ácido láctica (fermentação láctica). A Catharina Sour, como é uma cerveja *sour* (ácida), também é produzida com duas etapas de fermentação, sendo a primeira a fermentação láctica e a segunda alcoólica.

As bactérias acidoláticas (BAL) são gram-positivas, se apresentam em formato de cocos ou bacilos, não formam esporos e apresentam a característica de produzir ácido láctico a

partir de açúcares fermentescíveis. Esses microrganismos podem ser divididos em bactérias homofermentativas (*L. acidophilus*, *L. alimentarius*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. coryniformis*, *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. jugurti*, *L. jensenii*, *L. lactis*, *L. leichmannii*, *L. plantarum* e *L. salivarius*) que produzem ácido láctico como principal produto da fermentação da glicose (hexoses) e pelas bactérias heterofermentativas (*L. brevis*, *L. buchneri*, *L. cellobiosus*, *L. coprophilus*, *L. fermentum*, *L. hilgardii*, *L. sanfrancisco*, *L. trichoides*, *L. fructivorans* e *L. pontis*) que produzem etanol, ácido acético e dióxido de carbono, além do ácido láctico (AXELSSON, 2004; HUTKINS, 2006; MENDES & MENDES-FAIA, 2020; ZHENG et al., 2020; OBERG et al., 2022).

A principal diferença entre esses dois grupos é que as heterofermentativas não apresentam a enzima frutose 1,6-difosfato aldolase, sendo necessário à via das pentoses (Figura 2) para a metabolização de hexoses, além de diferirem em alguns aspectos referentes aos substratos utilizados e os metabólitos formados durante a fermentação. As BAL obtêm sua energia a partir da fosforilação de substratos durante a oxidação de carboidratos e são importantes para a produção de aroma e sabor dos produtos fermentados (LIU, 2003; AXELSSON, 2004; HUTKINS, 2006; WHITE; ZAINASHEFF, 2010; KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J., 2017; DYSVIK et al., 2020; MENDES & MENDES-FAIA, 2020; ZHENG et al., 2020; OBERG et al., 2022).

A família *Lactobacillaceae*, é classificada na ordem *Lactobacillales*, classe *Bacilli* e pertencente ao filo *Firmicutes* (*Bacillota*), a classificação em relação ao gênero é baseado nas características fenotípicas e ecológicas comuns entre as bactérias ácido-lácticas (SCHOCH et al., 2020).

Zheng et al., (2020) estudando o gênero *Lactobacillus* propôs a reclassificação desse gênero em 26 gêneros que são caracterizados por genes específicos comuns entre os membros de cada grupo. Além disso, também propôs a alteração da descrição da família *Lactobacillaceae* para incluir os gêneros que fazem parte das famílias *Lactobacillaceae* e *Leuconostocaceae*. O principal objetivo desses autores era agrupar esses microrganismos com características ecológicas e metabólicas semelhantes, pois a antiga classificação não era suficiente para representar a diversidade existente nesse gênero.

A classificação com base nas características fermentativas das BAL também foi modificada, contudo, embora na atualidade os termos “obrigatório” e “facultativo” não sejam

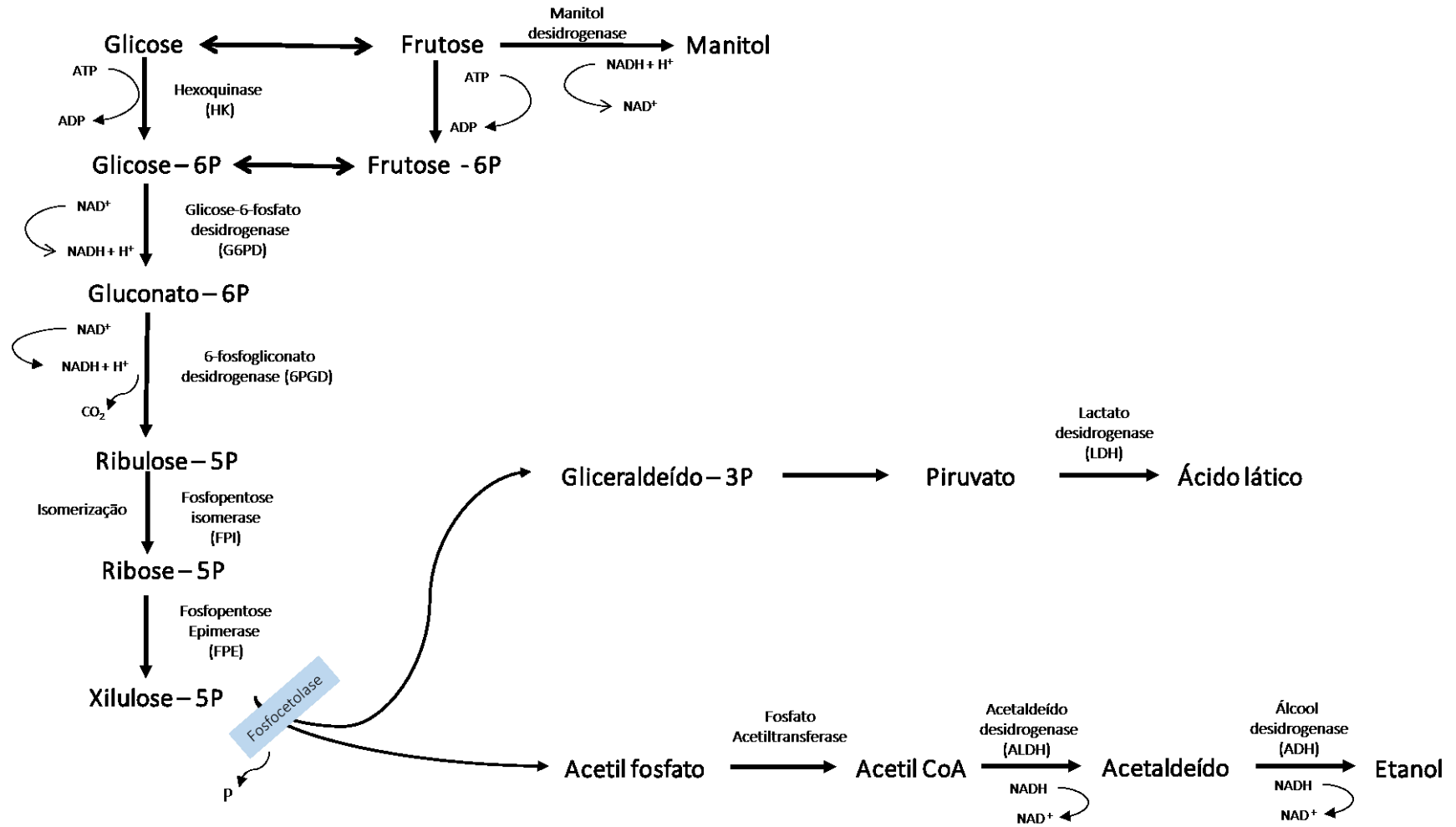
mais usados para classificar as BAL (ZHENG et al., 2020; OBERG et al., 2022), para um melhor entendimento da diferenciação entre esses microrganismos, essa classificação será utilizada durante esta revisão bibliográfica.

As espécies homofermentativas obrigatórias (*L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii* etc.) são as bactérias lácticas que convertem glicose em ácido láctico durante a via glicolítica. E as bactérias lácticas heterofermentativas obrigatórias (*L. fermentum*, *L. brevis*, *L. reuteri*, *L. sanfrancisco*, *L. buchneri*, entre outras.) usam a via oxidativa das pentoses fosfato (Figura 2) para fermentar a glicose-6P, desviada da via glicolítica, para a produção de ácido acético, CO₂ e ácido láctico. Esse processo ocorre devido ao fato das heterofermentativas apresentarem a enzima frutose 1,6-difosfato aldolase, além disso, essas BAL podem usar a enzima manitol desidrogenase para a regeneração do NAD, atuando como um receptor alternativo de elétrons e produzindo mais ATP. As BAL heterofermentativas facultativa (*L. plantarum*) podem usar tanto a via glicólica como a via das pentoses fosfato durante a fermentação (HUTKINS, 2006; KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J., 2017; MENDES & MENDES-FAIA, 2020; SCHOCH et al., 2020; OBERG et al., 2022).

As amostras adquiridas das etapas de produção dos dois chopes estilo Catharina Sour, analisadas durante este estudo, foram produzidas com os gêneros *Lactiplantibacillus* e *Lentilactobacillus*. Essas duas bactérias lácticas são da família *Lactobacillaceae*, diferindo no gênero e espécie, sendo a primeira da espécie *Lactiplantibacillus plantarum* e a segunda da *Lentilactobacillus buchneri*.

Na Figura 2 estão representados os metabólicos obtidos durante a via das pentoses e a produção de ácido láctico e etanol.

Figura 2 – Via das pentoses.



Fonte: Adaptado de Hutkins (2006).

2.2.6 Lúpulo

No século VIII, as cervejas eram produzidas com uma mistura de ervas chamada *gruit* (alecrim, absinto, artemísia, milefólio, zimbro, murta-do-brejo, urze e gengibre) conferindo aroma e sabor a bebida (NEVE, 1991). No entanto, devido aos altos preços e a dificuldade de obtenção, os cervejeiros começaram a buscar alternativas e, assim, o lúpulo, que já era conhecido desde o século IX, substituiu o *gruit* na produção da cerveja. Devido a ação conservante e adição de características sensoriais desejáveis que o lúpulo adicionava a cerveja, logo se tornou um ingrediente importante na produção, substituindo completamente o *gruit* e virando um ingrediente fundamental na produção dessa bebida (BAMFORTH, 2009; MORADO, 2017).

O lúpulo (*Humulus lupulus* Linnaeus) é uma planta trepadeira perene da família das *Cannabaceae* (NEVE, 1991; OETTERER; ALCARDE, 2006; BAMFORTH, 2009; STEWART, 2016), que produz flores dioicas (masculinas e femininas), sendo que apenas as flores femininas são utilizadas para produção de cerveja, pois produzem 150 vezes mais resina que a flor masculina (OETTERER; ALCARDE, 2006; DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019). Essas flores liberam glândulas de lupulina, um pó amarelo que contém resinas (alfa-ácidos e beta-ácidos), óleos essenciais, polifenóis com propriedades antioxidantes, proteínas, lipídios, ceras, celulose, aminoácidos esteroides, entre outros representados na Tabela 2 (NEVE, 1991; BAXTER; HUGHES, 2001; DURELLO; SILVA; BOGUSZ, 2019).

Normalmente o lúpulo (desidratado) é adicionado no início ou nos últimos 15 minutos do cozimento, pois embora os alfa-ácidos possam adicionar o amargor desejado, os beta-ácidos não se dissolvem durante a fervura causando os *off-flavors*, que são aromas e sabores indesejados. O lúpulo também atua na cerveja como conservante e evita a formação de espuma durante a fervura (STEWART, 2016; ANDERSON et al., 2019).

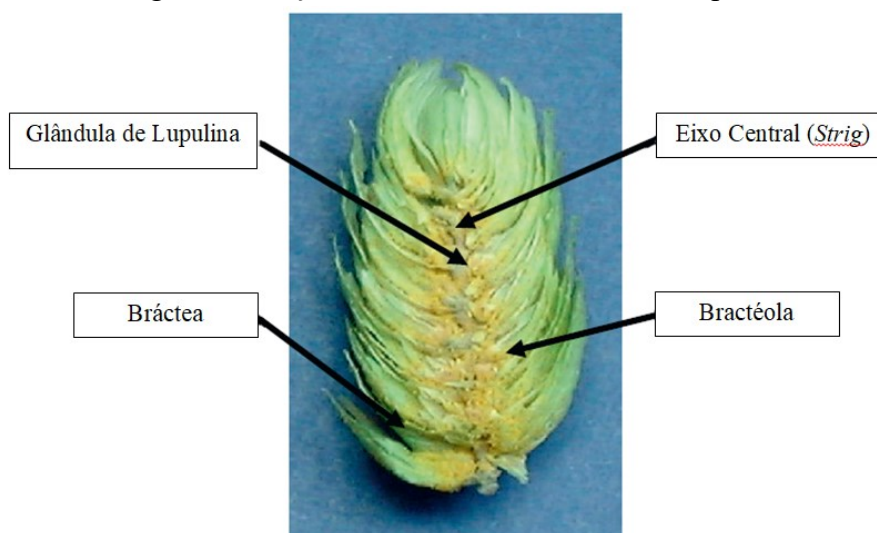
Na Tabela 2 estão descritos os constituintes majoritários em flores de lúpulo e na Figura 3 estão representadas as partes do cone de lúpulo.

Tabela 2 – Principais constituintes encontrados em flores secas de lúpulo.

Constituinte	Concentração (% m/m)
Resinas totais	15 – 30
Óleos essenciais	0,5 – 3
Proteínas	15
Monossacarídeos	2
Polifenóis (taninos)	4
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Ceras e esteroides	Traços – 25
Cinzas	8
Água	10
Celulose/lignina	43

Fonte: Durello; Silva; Bogusz (2019).

Figura 3 – Seção transversal de um cone de lúpulo.



Fonte: Adaptado de Stewart (2016).

2.2.7 Adjuntos

“O adjunto cervejeiro é qualquer carboidrato diferente da cevada maltada que contribui com açúcares para o mosto de cerveja” (STEWART, 2016). Podem ser classificados em amiláceo, como o milho e o arroz que necessitam hidrolisar o amido antes de serem adicionados no mosto, já os açucarados normalmente são utilizados como xaropes, podendo ser adicionados diretamente no mosto (AQUARONE et al., 2001). A legislação brasileira permite a substituição da cevada em até 80% de outros cereais (trigo, aveia, arroz e milho), esse cereal adicionado dará o nome a essa cerveja (BRASIL, 2019).

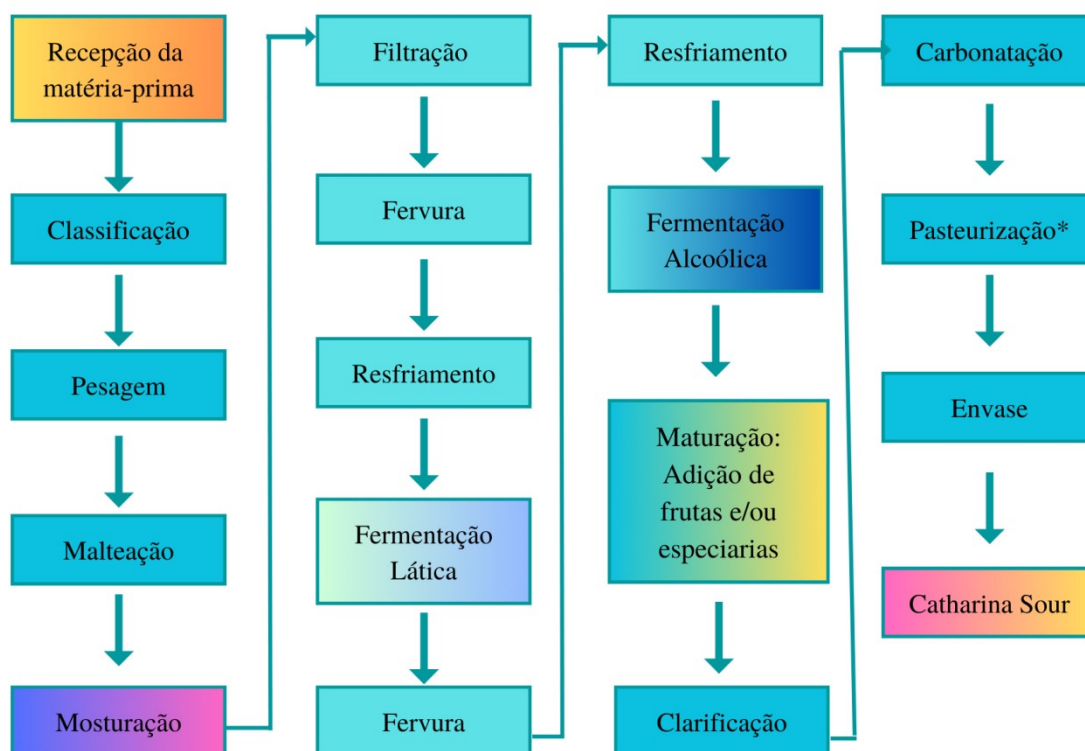
Esses adjuntos são usados para introduzir características específicas a uma cerveja, podendo modificar a cor, sabor, aroma, bem como fornecer melhor estabilidade coloidal, melhor resistência ao resfriamento e maior brilho. Além disso, também pode ser utilizado por razões econômicas buscando reduzir os custos da produção (STEWART, 2016; BOGDAN, 2017).

O trigo, a aveia e o centeio (não maltado), podem conferir texturas, corpo, aromas, sabores e contribuir para a formação e retenção de espuma. Já o milho e o arroz não maltados tornam a cerveja mais clara, leve e menos amarga. Para garantir um processo mais padronizado e com menor custo, as empresas costumam usar xaropes de maltose derivados desses cereais no lugar dos cereais propriamente ditos (BOGDAN, 2017; MORADO, 2017).

2.3 PRODUÇÃO DA CERVEJA

A produção da cerveja é um processo que pode ser dividido em três etapas principais: Produção do mosto (moagem, mosturação, filtração, fervura e resfriamento), processo fermentativo (fermentação e maturação) e acabamento (clarificação, pasteurização e envase) (AQUARONE et al., 2001; BRIGGS et al., 2004), essas etapas podem sofrer modificações dependendo do tipo de cerveja produzido. A elaboração da cerveja estilo Catharina Sour é realizada de acordo com o processo conhecido como *Kettle Sour*, uma técnica que consiste na fermentação do mosto pela ação de bactérias lácticas (fermentação láctica) e uma segunda fermentação (alcoólica) com a levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (HARRISON; ALBANESE, 2017; DYSVIK et al., 2020; BJCP, 2021). O fluxograma com as etapas de produção da cerveja estilo Catharina Sour é apresentado na Figura 4, contudo, vale ressaltar que se a produção for de chope, não ocorrerá à etapa de pasteurização da cerveja.

Figura 4 – Fluxograma do processamento da cerveja estilo Catharina Sour.



Legenda: * O chope não passa pela etapa de pasteurização.

Fonte: Adaptado de Harrison; Albanese (2017).

2.3.1 Produção do Mosto

O processo de produção inicia com a recepção da matéria-prima, em seguida corre a classificação por tamanho e retirada de grãos avariados. Após esse processo, esses grãos são aspirados e peneirados para remover impurezas e, por último, é realizada a pesagem (BRIGGS et al., 2004).

Na moagem, os grãos são esmagados para a exposição do endosperma amiláceo a fim de facilitar a ação das enzimas na etapa de mosturação. A moagem pode ser realizada utilizando rolos para preservar as cascas que serão utilizadas na etapa de filtração (MORADO, 2017) e também com a umidificação dos grãos, evitando a trituração da casca e a excessiva produção de farinha (AQUARONE et al., 2001; OETTERER; ALCARDE, 2006). Se essa etapa for realizada incorretamente pode gerar perdas de produção, menor densidade do mosto, adstringência e dificultar a etapa de filtração/clarificação devido ao alto teor de material mucilaginoso (BRIGGS et al., 2004).

A seguinte etapa é a de mosturação, que transforma os ingredientes (água, lúpulo, malte e adjuntos) em mosto. Esse mosto é constituído de 10 a 15% por substâncias solúveis oriundas do malte e de 85 a 90% por produtos da degradação de macromoléculas pela ação das enzimas presente no malte (AQUARONE et al., 2001; OETTERER; ALCARDE, 2006; MORADO, 2017). Durante essa etapa é importante o controle da temperatura, acidez, pH e tempo, pois podem influenciar na ação das enzimas (BRIGGS et al., 2004; HARRISON; ALBANESE, 2017).

Em relação às enzimas, as α -amilases hidrolisam o amido em dextrina na temperatura entre 67 e 72 °C e em pH entre 5,3 e 5,7, esse açúcar não é fermentado pelas leveduras, produzindo cervejas mais doces e encorpadas; nas temperaturas entre 62 e 66 °C e pH entre 5,0 e 5,5, as β -amilases produzem maltose que é usada pelas leveduras durante a fermentação (PALMER, 2006). Já as enzimas proteolíticas (peptidase e protease), na temperatura entre 45 e 55 °C e pH de 4,2 a 5,3, produzem peptídeos e aminoácidos que são utilizados pelas leveduras para o seu crescimento e desenvolvimento, além de contribuir para a formação e retenção da espuma e redução da turbidez. Além dessas, as fosfatases liberam íons fosfatos (orgânicos) para o mosto e as betaglucanases, em temperaturas de 40 a 45 °C, hidrolisam o carboidrato betaglucano (fibra solúvel) que pode causar problema durante a filtração e deixar a cerveja turva (AQUARONE et al., 2001; BAXTER; HUGHES, 2001; OETTERER; ALCARDE, 2006; EWART, 2016; MORADO, 2017).

Após a mosturação, é realizada a filtração, esse processo pode ser realizado com filtro de placas (indústrias) ou em tina de clarificação. Na filtração ocorre à separação do bagaço (elemento filtrante) do extrato líquido, em seguida, o resíduo obtido passa por um processo de lavagem (*sparging*) para a retirada do extrato retido na torta e elevar o rendimento do processo. A temperatura deve estar em torno de 75 °C para uma melhor filtração, pois o mosto estará com menor viscosidade, contribuindo para a retirada de taninos, polifenóis e amido residual da casca (BAXTER; HUGHES, 2001; OETTERER; ALCARDE, 2006).

Após o processo de filtração, o mosto é aquecido com o objetivo de eliminar microrganismos, inativação de enzimas, precipitação de taninos e proteínas (controle da turbidez), evaporação da água (concentração do mosto) e volatilização de substâncias não desejáveis como o diacetil, que compromete o sabor final da cerveja (HARRISON;

ALBANESE, 2017). Além disso, é nessa etapa que normalmente é realizada a adição do lúpulo (desidratado), podendo ser adicionado no início da fervura para conferir amargor ou nos últimos minutos (*hopping*) para a incorporação de aromas (STEWART, 2016).

A seguinte etapa é o resfriamento que tem o objetivo de diminuir a temperatura fornecendo as condições ideais para a levedura realizar a fermentação. Para a produção da Catharina Sour, a temperatura é reduzida para próximo de 37 °C e pH de 5,2 para a fermentação láctica (*Lactobacillus*) e de 15 a 25 °C para a fermentação do tipo *Ale* (alta fermentação). Após esse processo é realizado a aeração do mosto para iniciar o processo fermentativo (OETTERER; ALCARDE, 2006; ROSA, AFONSO, 2014; MORADO, 2017).

2.3.2 Processo fermentativo

O processo fermentativo inicia com a glicólise (*Embden-Meyerhof-Parnas*) e a oxidação de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato e duas moléculas de ATP. Em seguida, essas moléculas de ácido pirúvico são reduzidas por duas moléculas de NADH para a formação de duas moléculas de ácido láctico, durante a fermentação láctica. Na fermentação alcoólica, essas duas moléculas de ácido pirúvico são convertidas em duas moléculas de acetaldeído e CO₂, posteriormente esse acetaldeído é reduzido por duas moléculas de NADH formando duas moléculas de etanol, como representado na Figura 5 (AQUARONE et al., 2001; BRIGGS et al., 2004; WHITE; ZAINASHEFF, 2010; KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J., 2017; MENDES & MENDES-FAIA, 2020).

Durante a fermentação, as leveduras utilizam açúcares fermentescíveis como a sacarose, glicose, frutose, maltose e maltotriose. Sendo a maltose e a maltotriose os principais açúcares presentes do mosto que durante o metabolismo da levedura são utilizados para a produção de etanol, CO₂, ácidos orgânicos (láctico, succínico, acético, pirúvico e outros), álcoois superiores, acetaldeído, entre outros compostos (AQUARONE et al., 2001; WHITE; ZAINASHEFF, 2010; DYSVIK et al., 2020).

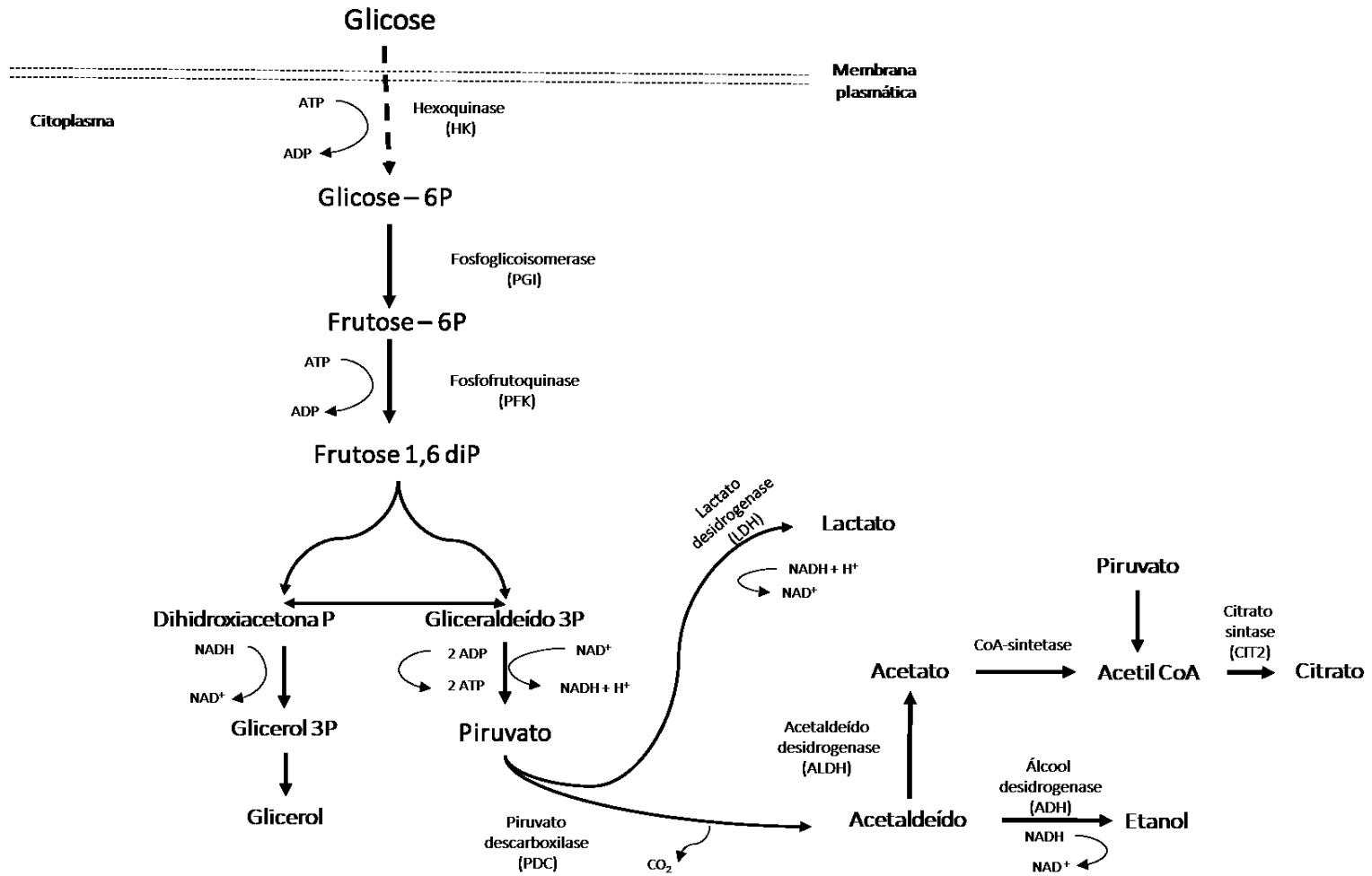
Para cervejas ácidas como a Catharina Sour, a primeira fermentação é realizada com a inoculação da bactéria láctica (fermentação láctica), mantendo a temperatura do mosto próximo de 37°C. Durante essa etapa é realizado o acompanhamento do mosto até atingir entre pH 4-3,5, momento em que a fermentação é interrompida para seguir para a próxima etapa do processo. O tempo necessário para chegar nesse pH irá depender de fatores como

qual o *Lactobacillus* utilizado, composição (ingredientes utilizados) e pH do mosto. Essa fermentação é a principal responsável pela acidez desse estilo de cerveja (DYSVIK et al., 2020).

A segunda fermentação é do tipo *Ale* (alta fermentação) com a inoculação de leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse caso, o mosto é mantido em temperatura entre 15 a 25 °C por 5 a 7 dias (HARRISON; ALBANESE, 2017), nesse período as leveduras irão consumir os açúcares fermentescíveis e produzir álcool, dióxido de carbono, ésteres, ácidos orgânicos, álcoois superiores e outros subprodutos que irão fornecer as características sensoriais e físico-químicas da cerveja (BAXTER; HUGHES, 2001).

As etapas do processo fermentativo estão representadas na Figura 5, no qual se podem observar os metabólicos obtidos durante a via glicolítica e a produção de lactato e etanol a partir do piruvato, em condição de anaerobiose.

Figura 5 – Via glicolítica e a produção de lactato e etanol a partir do piruvato.



Fonte: Adaptado de Hahn-Hagerdal et al. (1994) e Bai; Anderson; Moo-Young (2008).

Após a fermentação é realizado a maturação da “cerveja verde”, nessa etapa ocorrem reações físico-químicas que transformam os aspectos sensoriais da cerveja (BRIGGS et al., 2004). O tempo de maturação irá depender do tipo de cerveja que será produzida e, normalmente, ocorre a temperaturas próximas a 0 °C (HARRISON; ALBANESE, 2017).

Durante essa etapa também ocorre à redução dos teores de diacetil (aroma de manteiga rançosa), acetaldeído, ácido sulfídrico e o aumento do teor de ésteres (acetato de etila e acetato de amila), que contribuem para o aroma e sabor da cerveja, além disso, é durante essa etapa que as frutas e/ou especiarias são adicionadas (BRIGGS et al., 2004; MORADO, 2017) e ocorre à clarificação pelo processo de sedimentação, contribuindo para a estabilidade da cerveja e redução da turbidez, com eliminação de resíduos (*trub*) indesejados (BAXTER; HUGHES, 2001; PALMER, 2006).

2.3.3 Acabamento

O envase é o processo de engarrafamento ou enlatamento da cerveja, sendo de suma importância a esterilização das embalagens que foram utilizadas e o rigoroso controle de qualidade nessa etapa para evitar a contaminação do produto. Após o envase, é realizado o processo de carbonatação que pode ser feita pela adição direta de CO₂ ou pela técnica de *priming*. Na injeção direta (carbonatação forçada), o CO₂ é adicionado diretamente no recipiente que contém a bebida, e na técnica *priming*, é realizada a adição de açúcar fermentável dentro da embalagem da cerveja, entretanto, essa técnica costuma ser realizada principalmente na produção artesanal (PALMER, 2006; BAMFORTH, 2009).

Durante essa etapa também é realizada a pasteurização da cerveja, contudo, caso a cerveja não seja submetida a esse processo o outro tratamento térmico similar ou equivalente, receberá o nome de "chopp" ou "chope" (BRASIL, 2019). Essa etapa é importante para a estabilidade microbiológica e para o *shelf life* das cervejas, permitindo que sejam armazenadas por mais tempos sem grandes alterações devido a presença de microrganismos residuais da produção (AQUARONE et al., 2001).

A pasteurização pode ser realizada antes ou após o envasamento. Quando realizada antes, a cerveja passa, normalmente, através de um trocador de calor com temperaturas entre 71 a 75°C por 15 a 30 segundos, seguida de resfriamento até 10°C (HARRISON; ALBANESE, 2017). Na pasteurização após o envase, as garrafas ou latas passam,

normalmente, por câmaras com jatos d'água com temperatura entorno de 60 a 70 °C por 10 a 20 minutos, também ocorrendo o resfriamento no final do processo (BAMFORTH, 2009; ROSA, AFONSO, 2014). Para verificar a eficácia desse tratamento térmico sobre os microrganismos, é utilizado o conceito de Unidade de Pasteurização (UP), em que 1 UP será igual a 1 minuto a 60°C, sendo, normalmente, utilizado a faixa de 15 a 30 UP, pois valores superiores a 30 UP podem causar alterações no sabor da cerveja e na formação de espuma (DILAY et al., 2006), entretanto, na prática, a pasteurização da cerveja pode chegar a 60 UP na pasteurização com trocador de calor em placa. Nesse caso, a alta temperatura, junto com a presença de oxigênio, podem causar alterações sensoriais, como sabor de “cozido”, “biscoito” ou “tostado” na cerveja (AQUARONE et al., 2001).

Após todo esse processo, a cerveja é encaminhada para a comercialização com validade entre 3 a 12 meses (ROSA, AFONSO, 2014; HARRISON; ALBANESE, 2017).

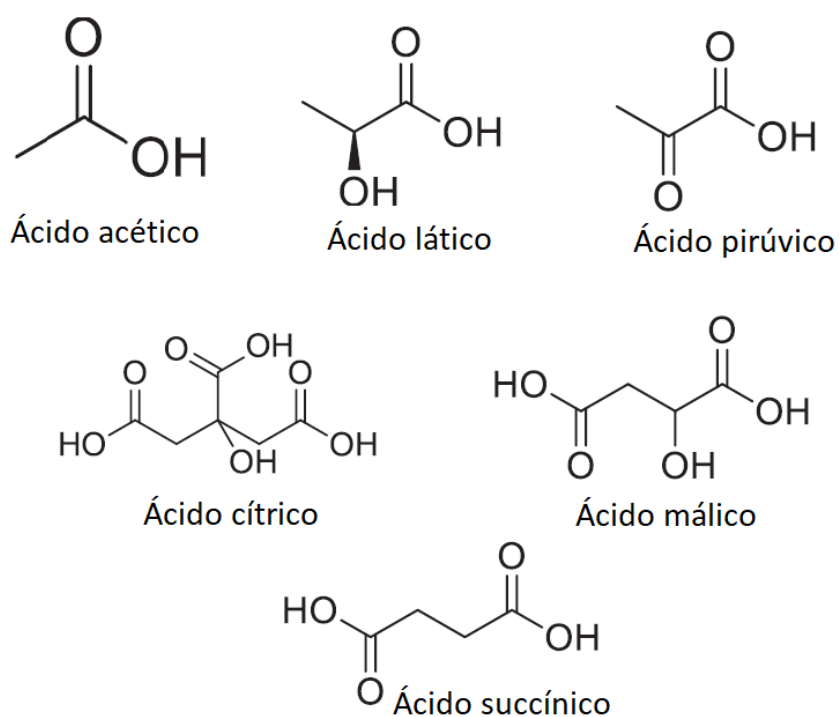
2.4 ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS (AOA) EM CERVEJAS

Os ácidos orgânicos são compostos produzidos por plantas, animais e microrganismos, podendo ser produtos intermediários ou finais em inúmeras vias importantes de metabolismo e catabolismo. São classificados com base no número de grupos carboxílicos (monocarboxílicos, dicarboxílicos e tricarboxílicos), na natureza da cadeia carbônica (aromático, alifático, alicíclico e heterocíclico) e também podem ser classificados em saturados e insaturados (ERNY et al., 2009; PAPAGIANNI, 2011; CHAHARDOLI et al., 2020).

Os AOA são compostos de baixa massa molar ($45-220 \text{ g mol}^{-1}$), geralmente são solúveis em água e apresentam estrutura química e mobilidade eletroforética semelhantes (BRUGNEROTTO et al., 2019). A concentração desses ácidos na cerveja vai depender principalmente do processo fermentativo, da composição do mosto, da levedura utilizada e das etapas de processamento (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005; ANDERSON et al., 2019). Além disso, os parâmetros de maltagem, tipo de grão, ano de coleta, estado de maturação, composição do solo (região), secura e microflora específica dos grãos, podem influenciar nessa composição (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005; ERNY et al., 2009; TYRELL, 2013).

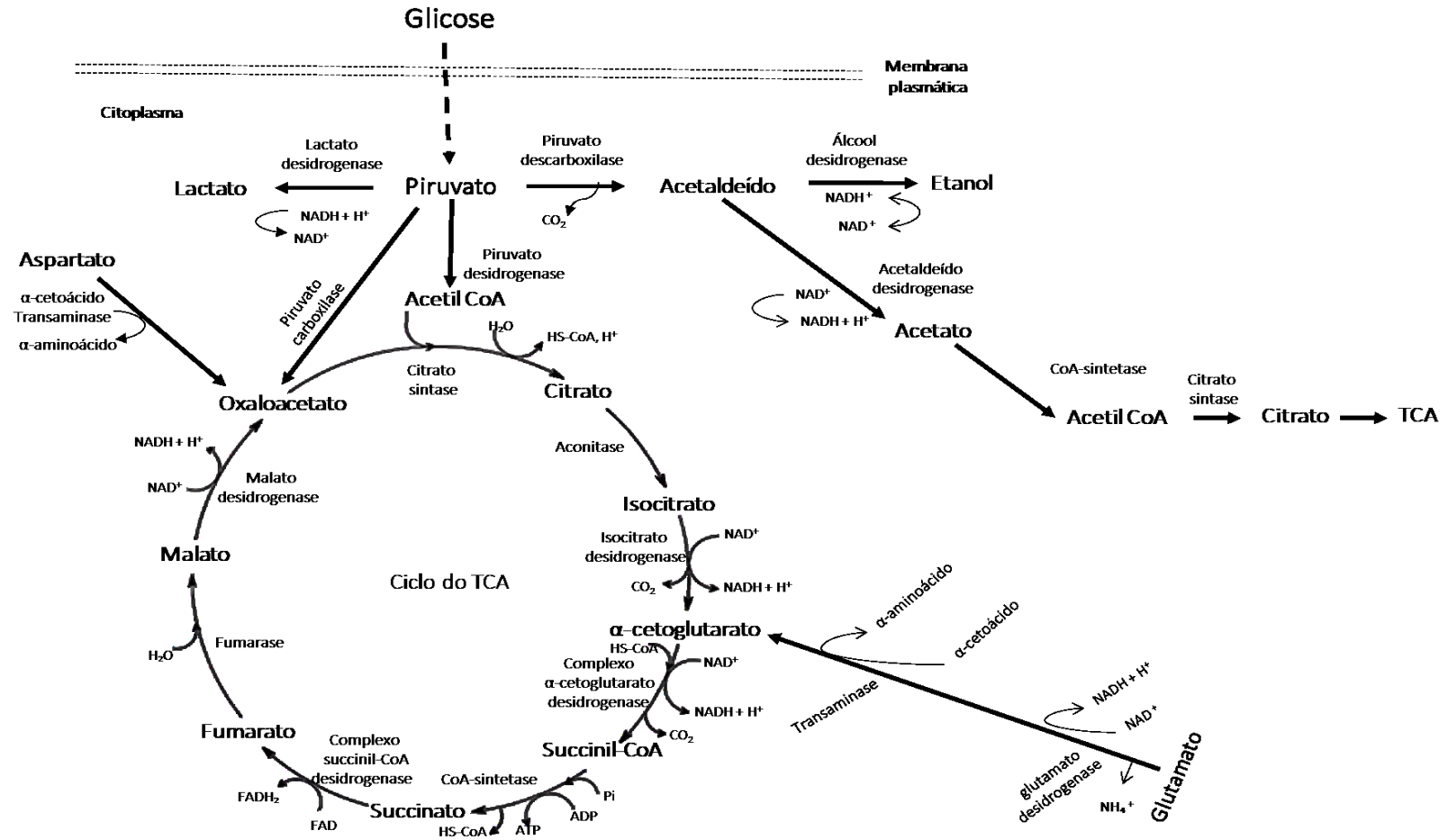
Os principais ácidos orgânicos encontrados nas cervejas são o ácido láctico, cítrico, acético, succínico, málico e pirúvico (MONTANARI et al., 1999; BRIGGS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2010; HONG; FANG, 2015; ANDERSON et al., 2019; KOZAKI et al., 2019). Esses ácidos são oriundos principalmente das reações bioquímicas que ocorrem durante o processo fermentativo (BRIGGS et al., 2004; ERNY et al., 2009; BLEOANCA, 2013). Na Figura 6 está demonstrada a representação estrutural desses compostos e na Figura 7 estão representadas as vias metabólicas de produção desses ácidos orgânicos e etanol.

Figura 6 – Estrutura química dos principais ácidos orgânicos alifáticos comumente encontrados em cervejas.



Fonte: Adaptado de Chahardoli, (2020).

Figura 7– Vias metabólicas de produção dos ácidos orgânicos e etanol.



Fonte: Adaptado de Hahn-Hagerdal et al. (1994) e De Klerk, (2010).

A análise dos ácidos orgânicos presente nas cervejas é de suma importância, pois afetam as propriedades sensoriais, como a acidez das cervejas *Sour*, a estabilidade microbiológica e físico-química (BRIGGS et al., 2004; CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005; SANTALAD et al., 2007; ERNY et al., 2009; UGALDE et al., 2022), bem como a composição nutricional dessa bebida. Além disso, a identificação e quantificação desses ácidos são importantes para avaliar a qualidade da cerveja (HONG; FANG, 2015; ANDERSON et al., 2019; UGALDE et al., 2022), verificar possíveis adulterações (SANTALAD et al., 2007) e distinguir entre diferentes tipos de cervejas com base em seus perfis de ácidos orgânicos, principalmente os ânions orgânicos como piruvato, citrato, succinato e malato que podem diferir dependendo do tipo de levedura utilizada e das condições de fermentação (CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005; KOZAKI et al., 2019; UGALDE et al., 2022).

Devido ao metabolismo das leveduras durante a fermentação, esses ácidos sofrem alterações relevantes, além disso, como a *S. cerevisiae* não utiliza o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), em condição de anaerobiose, são utilizadas enzimas citosólicas como fonte de precursores biossintéticos, como a Mdh2 (Malato desidrogenase) citosólica que participa da síntese e degradação do malato (MENDES & MENDES-FAIA, 2020).

O ácido láctico é importante para as cervejas como a *Berliner Weisse* e *Catharina Sour*, pois sua presença contribui para a acidez típica dessas cervejas. Além disso, esse ácido, juntamente com os ácidos acético e málico, contribui para a conservação, inibindo a proliferação de bactérias deteriorantes, como *Escherichia coli* e *Salmonella* spp (LI et al., 2007; DAS et al., 2014), além de ser um importante aliado nas análises para diferenciar cervejas, visto que sua concentração pode mudar dependendo do tipo de cerveja. Esse ácido é oriundo da matéria-prima presente no mosto, mas também é produzido durante a etapa de fermentação, sendo formado a partir da redução do piruvato pela ação da enzima lactato desidrogenase (LDH), como representado na Figura 5 (AQUARONE et al., 2001; WHITE; ZAINASHEFF, 2010). Na fermentação láctica, esse ácido é produzido, principalmente, pelas bactérias lácticas homofermentativos que degradam o açúcar produzindo, quase que exclusivamente, ácido láctico (DYSVIK et al., 2020; MENDES & MENDES-FAIA, 2020).

O ácido succínico é um dos ácidos mais importantes produzidos durante a fermentação, pois é um intermediário do ciclo TCA. Esse ácido pode ser formado a partir de

quatro vias, a primeira pela via redutora do ciclo TCA, nessa via o ácido pirúvico é reduzido a malato que irá perder uma molécula de água para ser convertido a fumarato e posteriormente esse ácido é reduzido a succinato. A segunda via é a via oxidativa do ciclo TCA. A terceira é pelo ciclo do glioxilato, nesse caso, o isocitrato é dividido em glioxilato e succinato, em seguida a enzima malato sintase condensa o Acetil-CoA e o glioxilato formando o malato, através da via oxaloacetato e das reações da via gliconeogênica, o malato é convertido em glicose. As leveduras utilizam essa via quando em ausência de fontes de carboidratos, mas na presença de outros precursores disponíveis, como o etanol e o ácido acético, contudo, essa via, normalmente, é suprimida durante a fermentação na cerveja. A quarta via é através do catabolismo de aminoácidos (aspartato e glutamato). As representações dessas vias, com exceção da via do glioxilato, estão representadas na Figura 7 (WHITING 1976; HEERDE; RADLER, 1978; DE KLERK, 2010; CHIDI et al., 2018; MENDES & MENDES-FAIA, 2020). Um dado importante é que o ácido succínico não tem uma função específica para a levedura, sendo produzido por sua ação antimicrobiana para conferir uma vantagem à levedura durante a fermentação (ANDERSON et al., 2019). Além disso, esse ácido estimula a secreção de ácido gástrico causando azia e por isso as indústrias buscam minimizar o seu teor nas cervejas para aumentar a sua *drinkability* (TYRELL, 2013).

O ácido cítrico tem ação antioxidante, muito importante para a qualidade da cerveja durante o armazenamento. Esse ácido, junto com os ácidos tartárico e málico, contribui para o sabor da cerveja, contribuindo para a sua palatabilidade. Além disso, também é usado na indústria de alimentos como antioxidante e como agente de retenção de cor (ANDERSON et al., 2019; UZHEL et al., 2021). Além do ácido cítrico (INS 330), a legislação permite a adição de ácido láctico (INS 270) e málico (INS 296) como agente acidulante e regulador de acidez (BRASIL, 2011b).

O ácido acético é quantitativamente o ácido volátil mais importante produzido pela levedura, sendo produzido principalmente no início do processo, devido às altas concentrações dos açúcares (condições hiperósmicas) no mosto (WHITING 1976; ERASMUS et al., 2003). Esse ácido pode ser sintetizado a partir da oxidação irreversível do acetaldeído a acetato (Figura 7) ou devido à contaminação com bactérias aeróbica do ácido acético, assim, a origem desse ácido é um fator importante para avaliar a qualidade do processo fermentativo (COOTE; KIRSOP, 1974; HONG; FANG, 2015; ANDERSON et al., 2019). O acetato produzido pode ser utilizado para a formação do Acetil-CoA que será

convertido em citrato e posteriormente irá participar do ciclo TCA (AQUARONE et al., 2001; MENDES & MENDES-FAIA, 2020). A concentração desse ácido pode variar se a levedura for submetida a estresse osmótico, nesse caso, a levedura irá produzir glicerol para contrabalancear a pressão osmótica, deste modo, o acetaldeído não será reduzido a etanol e será oxidado a acetato. O acetato será utilizado como via para a regeneração do NAD^+ , assim, esse ácido irá contribuir para o equilíbrio redox, convertendo NAD^+ em NADH (ERASMUS et al., 2003; CHIDI et al., 2018).

2.4.1 Determinação de ácidos orgânicos alifáticos (AOA) em cervejas

Para a determinação de AOA, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (MONTANARI et al., 1999; LI et al., 2007; DAS et al., 2014; ANDERSON et al., 2019), a cromatografia iônica (IC, do inglês *ion chromatography*) (HONG; FANG, 2015; UZHEL et al., 2021), a cromatografia de exclusão de íons/troca de cátions (IEC/CEC, do inglês *ion-exclusion/cation-exchange chromatography*) (KOZAKI et al., 2019) e a cromatografia gasosa com espectrometria de massas (GC-MS, do inglês *gas chromatography-mass spectrometry*) e infravermelho (IR, do inglês *infrared*) (FARAG et al., 2019) são técnicas consolidadas. No entanto, essas técnicas apresentam algumas desvantagens, tais como alto custo operacional, exaustivo preparo de amostras (para evitar o efeito matriz) e necessidade de elevados volumes de reagentes (LIU et al., 2017). Além dessas, a ressonância magnética nuclear (RMN, do inglês *nuclear magnetic resonance*) (RODRIGUES et al., 2010) é outra alternativa para essas análises, no entanto, essa técnica apresenta alto custo de aquisição do equipamento.

Embora essas técnicas sejam as mais utilizadas, a eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*) é uma poderosa aliada para a identificação desses compostos com baixo consumo de amostras e reagentes, mínima geração de resíduos, velocidade, facilidade de operação e simplificado preparo de amostra, sendo, geralmente, realizado com um simples processo de degaseificação, filtração e diluição (SOGA; ROSS, 1997; CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005; ERNY et al., 2009).

Além disso, oferece grande versatilidade de detecção, como a eletroforese capilar de zona com detecção indireta de UV (CZE-UV-Vis, do inglês *capillary zone electrophoresis with ultraviolet-visible detector*) (DEVRIES, 1993; KLAMPFL, 1999; LIU et al., 2017); a eletroforese capilar de zona com detector de arranjo de diodo (CZE-DAD, do inglês *capillary zone electrophoresis with diode-array detector*) (SOGA; WAKAURA, 1997; CORTACERO-RAMÍREZ et al., 2005; SANTALAD , 2007; ERNY et al., 2009; RODRIGUES et al., 2010; UGALDE et al., 2022), entre outros detectores que permitem a análise de uma ampla variedade de substâncias (SANTALAD et al., 2007).

Durante a revisão bibliográfica, foram encontrados 16 artigos (Tabela 3) que analisaram AOA em cervejas, destes, apenas um analisou AOA em cerveja estilo Catarina Sour. Esses estudos foram realizados com diferentes técnicas e em diferentes estilos de cervejas, os resultados obtidos durante esses estudos demonstraram que apesar da variação nas concentrações, alguns ácidos foram encontrados em basicamente todos os estilos, como, por exemplo, o ácido láctico que foi identificado em 15 dos 16 artigos analisados.

Na Tabela 3 estão representados os estudos que avaliaram AOA em amostras de cerveja.

Tabela 3 – Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes amostras de cerveja.

Continuação

Referência	Amostras	AOA investigados	AOA encontrados e faixa de concentração (mg/L)	Técnica
GHESTI et al., 2023	Cerveja piloto (Catharina Sour)	Acético, succínico, cítrico e lático	Acético (1870); succínico (7340); cítrico (3020); lático (9690)	HPLC
UGALDE et al., 2022	Cerveja <i>pilsner</i>	Acético, cítrico, lático, málico, oxálico, pirúvico e succínico	Lático (94, 61- 333,83); pirúvico (135,59-231,49); succínico (62,81-86,58)	DOI/CE-DAD
UZHEL et al., 2021	Cerveja <i>light</i> * (tipo não identificado)	Acético, cítrico, fórmico, glucônico, lático, málico, oxálico, pirúvico e succínico	Acético (230); cítrico (290); fórmico (30); glucônico (110); lático (570); málico (120); oxálico (20); pirúvico (110); succínico (90)	IC
DAS et al., 2019	Cerveja de arroz	Acético, lático, glucônico e propiónico	Acético; lático; glucônico; propiónico**	GC-MS
FARAG et al., 2019	Amostras de resíduos de cerveja	Acético, cítrico, lático, málico, pirúvico e succínico	Acético; cítrico; lático; málico; oxálico; tartárico; succínico**	IR e GC-MS
KOZAKI et al., 2019	Cervejas de diferentes países	Acético, cítrico, lático, málico, pirúvico e succínico	Acético (117-351); lático (28,6-309); málico (6,84- 62,82); pirúvico (37,4-188); succínico (49-120)	IEC/CEC

Tabela 4 – Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes amostras de cerveja.

Continuação

Referência	Amostras	AOA investigados	AOA encontrados e faixa de concentração (mg/L)	Técnica
LIU et al., 2017	Cervejas de diferentes marcas	Acético, cítrico, fórmico, glucônico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico e tartárico	Acético (35-103,8); cítrico (200,8-314,8); láctico (62,2-128,5); málico (39,7-63,6); succínico (26,6-48,6)	CE-DAD
PAI et al., 2015	Cervejas tipo <i>Lager</i>	Acético, cítrico, fumárico, láctico, málico, oxálico, pirúvico, succínico e tartárico	Acético (nd-108); cítrico (nd-116); fumárico (nd-44); láctico (média de 128); málico (nd-63); pirúvico (44); succínico (nd- 555.63); tartárico (nd- 677,49)	HPLC
RODRIGUES et al., 2010	Cerveja tipo <i>Lager</i>	Acético, cítrico, láctico, málico, pirúvico e succínico	Acético (140,1-159,9); cítrico (nd-300); láctico (177,6-250,8); málico (141,9-201); pirúvico (105-150); succínico (106,5-150)	RMN e CE-DAD
ERNY et al., 2009	Cerveja tipo <i>Lager</i>	Acético, cítrico, láctico, málico, malônico, pirúvico, succínico e tartárico	Acético (51,7); cítrico (173); láctico (77,6); málico (94,6); pirúvico (60,3); succínico (88,7)	CE-DAD

Tabela 5 – Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes amostras de cerveja.

Continuação

Referência	Amostras	AOA investigados	AOA encontrados e faixa de concentração (mg/L)	Técnica
SANTALAD et al., 2007	Cerveja (estilo não identificado)	Acético, cítrico, glutárico, lático, málico, malônico, oxálico, pirúvico, succínico e tartárico	Acético (50- 60); cítrico (410-650); glutárico (50); lático (320-450); málico (210-280); malônico (120-240); succínico (60-80)	CZE- DAD
CORTACERO- RAMÍREZ et al., 2005	Cervejas de malte e sem álcool	Acético, cítrico, lático, málico, pirúvico e succínico	Málico (73-184 mg/L); succínico (18-82); pirúvico (nd- 58)	CE-DAD
PÉREZ-RUIZ et al., 2004	<i>Estrella de Levante;</i> <i>Láger</i> (nome da cerveja); <i>Sol del Sur; San Miguel.</i>	Cítrico, lático, málico, oxálico e tartárico	Cítrico (74- 202); lático (559- 631); málico (40-68); oxálico (12-25); tartárico (nd-2)	HPLC-CL
KLAMPF, 1999	Cerveja de arroz, <i>Stout</i> (Cerveja escura, tipo <i>Ale</i>), branca (Cerveja de trigo de alta fermentação), sem álcool e <i>Pilsen</i>	Acético, cítrico, fórmico, lático, málico, oxálico, pirúvico, succínico	Acético (43-128); cítrico (137-193); fórmico (nd-6); lático (349-556); málico (31-87); oxálico (9-31); pirúvico (29-108); succínico (18-82)	CZE com detector de condutividade e UV

Tabela 6 – Ácidos orgânicos alifáticos investigados e encontrados em diferentes amostras de cerveja.

Conclusão.

Referência	Amostras	AOA investigados	AOA encontrados e faixa de concentração (mg/L)	Técnica
SOGA; WAKAURA, 1997	Cerveja (estilo não identificado)	Acético, cítrico, fórmico, lático, málico, oxálico, pirúvico e succínico	Acético (102); cítrico (123); lático (58); pirúvico (62); succínico 65)	CE-DAD
DEVRIES, 1993	Cerveja piloto (estilo não identificado)	Acético, cítrico, lático, málico, pirúvico e succínico	Acético (46.98); cítrico (152.46); lático (76.27); málico (83.01); pirúvico (54.77); succínico (63.23)	CE

Legenda: * Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019 (MAPA); ** Concentração não informada; Não identificado (nd); Detecção de quimioluminescência (CL); Injeção dupla-oposta (DOI); Eletroforese Capilar (CE); Eletroforese Capilar de Zona (CZE); Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC); Detector Ultravioleta-Visível (UV-Vis); Detector de Arranjo de Diodos (DAD); Cromatografia iônica (IC); Cromatografia de exclusão de íons/troca de cátions de injeção única (IEC/CEC); Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de Massas (CG-MS); Ressonância magnética nuclear (RMN). Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2023).

Na Tabela 3 é apresentado o estudo realizado por Farag et al. (2019) que analisaram os constituintes de resíduos de cerveja encontrado em Hierakonpolis, Egito. Após a análise, os autores identificaram 22 ácidos orgânicos, o que representava 27,8% dos metabólitos primários presentes nesse resíduo de cerveja, sendo o ácido succínico o mais abundante com 7,3%, seguido pelo ácido oxálico com 4,7% e o láctico com 3,1%. Esse estudo demonstrou a presença desses ácidos desde o início da produção da cerveja.

No estudo realizado por Devries (1993), a autora quantificou os ácidos láctico, acético, cítrico, málico, pirúvico e succínico em amostras de cerveja (estilo não identificado) por CE com detecção de UV. Inicialmente as amostras foram desgaseificadas por sonicação e filtradas em membranas de 0,45 μm , em seguida, foram diluídas em água e ajustado o pH até 5,0 com hidróxido de sódio 0,5 M. O BGE foi composto por 5 mmol L^{-1} de hidrogenoftalato de potássio (do inglês, *Potassium hydrogen phthalate*) e 0,5 mmol L^{-1} de brometo de tetradeciltrimetilamônio (do inglês, *tetradecyltrimethylammonium bromide*). O capilar era de sílica fundida sem revestimento com 75 cm. A voltagem aplicada foi de 20 kV e o tempo de análise foi de 15 minutos.

Soga & Wakaura (1997), desenvolveram um método para análise de ânions orgânicos e inorgânicos (3 minerais e 9 ácidos orgânicos) em 4 amostras de cerveja (estilo não identificado) e em 4 amostras de mosto por CE-DAD. Inicialmente as amostras foram desgaseificadas por sonicação e diluídas, a amostra do mosto foi apenas diluído 1:5 com água antes da injeção. O BGE foi composto por 5 mmol L^{-1} do ácido 2,6-piridinodicarboxílico (PDC, do inglês *2,6-pyridinedicarboxylic acid*) e 0,5 mmol L^{-1} do ácido etilenodiaminotetracético (CTAB, do inglês, *Cetyl trimethylammonium bromide*), em pH 5.6. O capilar era de sílica fundida com 80,5 cm de comprimento total (72 cm de comprimento efetivo) e 75 μm de diâmetro interno (i.d). A análise foi realizada com a voltagem aplicada de -25 kV, com detecção indireta de UV e o tempo de análise foi de 7 minutos. Os autores conseguiram quantificar os ácidos láctico, acético, cítrico, málico, oxálico, fórmico, piroglutâmico, piruvato e succinato. Também compararam os resultados obtidos com os dados coletados da análise realizada por HPLC, demonstrando que o CE é uma boa técnica para análise de AOA em cervejas, apresentando menor tempo de análise e fácil preparo de amostras, além de boa sensibilidade.

Klampf (1999) também quantificou 9 ácidos orgânicos (lático, acético, cítrico, málico, oxálico, fórmico, piroglutâmico, piruvato e succinato) e 3 minerais em amostras de cervejas usando CE, entretanto, a análise foi realizada por condutividade (CD) e UV-indireto (UVD). Inicialmente as amostras (cerveja de arroz chinesa, cerveja branca, cerveja sem álcool e cerveja *pilsen*) foram desgaseificadas e diluídas com água. O BGE foi composto por 7,5 mmol L⁻¹ de ácido 4-aminobenzóico (p-AB, do inglês *4-aminobenzoic acid*) e 0,12 mmol L⁻¹ de brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB, do inglês *tetradecyltrimethylammonium bromide*), utilizado para inversão do fluxo eletrosmótico (EOF), em pH 5,75. O capilar utilizado era de sílica fundida com 48 cm de comprimento efetivo e 50 µm de i.d. A voltagem aplicada foi de -30 kV e o tempo de análise foi de 6 minutos para a detecção indireta de UV e de 8 minutos para detecção de condutividade. O Autor concluiu que as duas técnicas são consideradas adequadas para análise de ácidos orgânicos, entretanto, o autor observou que para ânions com migração mais rápida a detecção por CD se mostrou mais vantajosa e o UVD foi mais sensível para analitos com mobilidades semelhantes a do p-AB.

Cortacero-Ramírez et al. (2005), determinaram 19 ácidos orgânicos, sendo 8 AOA (cetoglutárico, fumárico, málico, mesacônico, oxálico, piroglutâmico, pirúvico e sórbico) e onze ácidos aromáticos, por CE-DAD. As mostras de cervejas de malte (Extra (6,4, v/v), Classic I e Classic II (4,6%, v/v), *Special* e *Special black* (5,4%, v/v), cerveja *light* (2%, v/v) e uma cerveja sem álcool (< 1%, v/v)) foram desgaseificadas e filtradas (filtro de 0,45 µm) antes da injeção. O BGE foi composto por 50 mmol/L de fosfato de sódio (do inglês, *sodium phosphate*), 25% de 2-propanol e 0,001% de brometo de hexadimetrina (HDB, do inglês *hexadimetrine bromide*), em pH 8. Foi utilizado um capilar de sílica fundida com 75 µm de i.d e comprimento total de 57 cm (comprimento efetivo de 50 cm) e a voltagem aplicada foi de 15 kV. O tempo de análise foi de 19 minutos para a quantificação dos 19 ácidos orgânicos. Segundo o autor, o HDB apresenta mais vantagens que o CTAB como modificador de fluxo eletrosmótico, visto que o HDB produz um revestimento na parede do capilar o deixando mais estável durante uma serie de corridas e reduzindo as interações indesejadas entre o capilar e a amostra. Além disso, o autor observou que o uso de 25% de 2-propanol como modificador orgânico, melhorou a resolução.

Santalad et al. (2007) quantificaram 11 ácidos orgânicos em duas amostras de cervejas (estilo não identificado) por CE-DAD. As amostras foram desgaseificadas, filtradas (membrana 0,45 µm), diluídas e derivatizadas com 2-nitrofenilhidrazina (2-NPH, do inglês 2-

nitrophenylhydrazine). O BGE foi constituído por 30 mmol/L de borato (do inglês, *borate*), em pH 10, e 100 ml/L de acetonitrila (ACN, do inglês *acetonitrile*), usado como modificador orgânico. Foi usado um capilar de sílica fundida com comprimento total de 40,0 cm (30,0 cm de comprimento efetivo) e 75 µm de i.d e a voltagem foi de 20 kV. Os autores concluíram que esse método com derivatização proporciona boa precisão e sensibilidade, visto que foram quantificados 9 ácidos (acético, láctico, subérico, glutárico, succínico, málico, malônico, tartárico e cítrico) em 12 minutos de análise.

Erny et al. (2009), também desenvolveu um método para análise de AOA (ácido málico, cítrico, succínico, pirúvico, acético e láctico) em amostras de cerveja *Lager* por CE-DAD de modo direto. Os autores afirmam que apesar da menor sensibilidade do modo direto, se comparado com o modo indireto, a técnica apresenta a vantagem de menor risco de co-migração com compostos desconhecidos presentes na matriz da cerveja, como o composto desconhecido (200 e 260 nm) detectado na vizinhança dos ácidos málico, cítrico e succínico que em muitas análises causam sobreposição dos picos não permitindo a quantificação desses compostos. As amostras de cervejas foram desgaseificadas, filtradas (0,22 µm) e diluídas com 1/3 do BGE. O BGE foi composto por 57,5 mmol/L de fosfato de sódio (do inglês, *Sodium phosphate*), em pH 7,34, e 0,1 mmol/L de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, do inglês *ethylenediaminetetraacetic acid*). O capilar utilizado foi de sílica fundida sem revestimento com 50 cm de comprimento total (40 cm de comprimento efetivo) e 50 µm de i.d, a voltagem foi de -20 kV e o tempo de análise foi entre 4,5-5 minutos. O polibreno-brometo de hexadimetrina (do inglês, *hexadimethrine bromide*) foi utilizado para a lavagem do capilar (adsorção passiva) para modificar o fluxo eletrosmótico sem a necessidade de adição no BGE, pois, segundo os autores, esse método evita perda de resolução ou o aumento do ruído na linha de base. Com essa metodologia os autores obtiveram um baixo limite de quantificação (LOQ), demonstrando que o modo direto é adequado para a quantificação de AOA, entretanto, embora tenham obtidos esses resultados, comparando com os resultados obtidos por Klampf (1999), os autores observaram que os valores de LOQ melhoram de 10 a 100 vezes no modo de detecção indireto, além disso, os autores não conseguiram comparar os resultados com os obtidos por Cortacero-Ramírez et al. (2005) que também utilizou o modo direto, pois apenas os ácidos málico e pirúvico foram comuns em ambas as análises.

Rodrigues et al. (2010), com o objetivo de desenvolver um modelo de regressão PLS1-NMR, analisou AOA (acético, cítrico, láctico, málico, pirúvico e succínico) em amostras

de cervejas por diferentes técnicas (CE-DAD/detecção indireta, CE-DAD/detecção direta, ensaios enzimáticos e RMN) como métodos analíticos de referência. Inicialmente as amostras de cerveja *Lager* de diferentes marcas foram desgaseificadas, filtradas (PDVF de 0,22 μm) e diluídas. O BGE para a detecção indireta foi composto por 5 mmol/L de PDC e 0,5 mmol/L de CTAB, usado como modificador eletrosmótico, em pH de 5,6. Também foi adicionado 0,01 mmol/L de EDTA para reduzir a interferências de traços de metais na análise do ácido cítrico. Para a detecção direta foi utilizado 7,5 mmol/L de NaH_2PO_4 , 2,5 mmol/L de Na_2HPO_4 , 2,5 mmol/L de Hidróxido de tetradeciltrimetilamônio (TTAOH, do inglês *Tetradecyltrimethylammonium hydroxide*) como modificador eletrosmótico e 0,24 mmol/L de CaCl_2 como modificador seletivo, em pH 6,4. O capilar utilizado foi de sílica fundida com 78 cm de comprimento total e 75 μm de i.d, a voltagem foi de 25 kV para detecção direta e 17 kV para indireta. Os autores observaram que a detecção indireta apresentou o melhor desempenho para o modelo de regressão para os ácidos málico, pirúvico e succínico, o direto para os ácidos acético e lático, e o enzimático para o ácido cítrico.

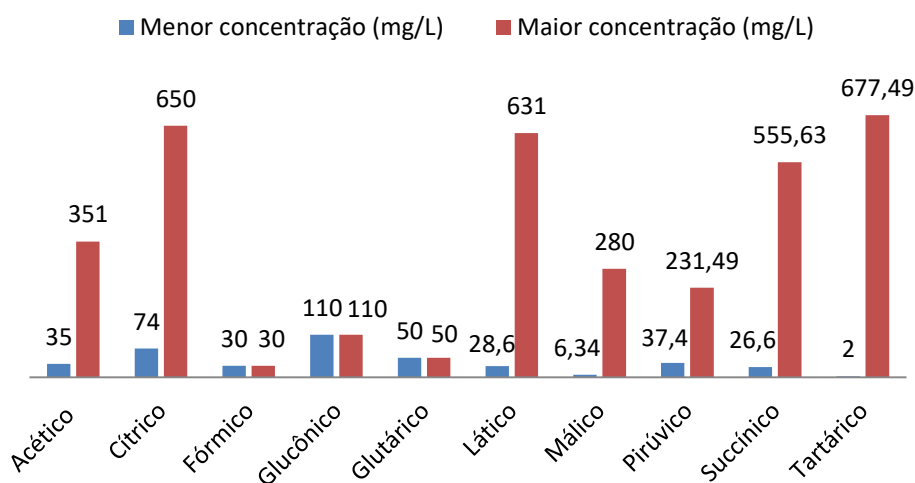
Liu et al. (2017) desenvolveram um método para análise de ácidos orgânicos (ácido oxálico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, lático, succínico e acético) em amostras de vinho de arroz e cerveja (estilo não identificado) usando o ácido 2,4-dihidroxibenzoico (DHBA, do inglês *2, 4-Dihydroxybenzoic acid*) como cromóforo. As amostras foram filtradas (membrana de nylon 0,45 μm) e diluídas. O BGE foi composto por 10 mmol/L de DHBA, em pH 3,6, com 0,4 mmol/L de CTAB. O capilar utilizado foi de sílica fundida sem revestimento com comprimento total de 50 cm (41,5 cm de comprimento efetivo) e 75 μm i.d, a voltagem foi de -20 kV e o tempo de análise foi de 4 minutos. Os autores observaram que o DHBA apresentou maior sensibilidade aos ácidos orgânicos quando comparado com o ácido o-clorobenzoico (OCBA, do inglês *o-chlorobenzoic acid*), também observaram que na ausência de modificador orgânico o tempo da análise foi menor. Segundos os autores, esses resultados demonstram que o DHBA é uma boa opção para a determinação de ácidos orgânicos em vinhos de arroz e cerveja.

Ugalde et al. (2022) desenvolveram um método CE-DAD para a determinação simultânea de minerais (potássio, sódio, cálcio, magnésio, cloreto, nitrato, sulfato e fosfato) e AOA (acético, lático, cítrico, málico, oxálico, pirúvico e succínico) em amostras de cerveja *pilsner* utilizando a técnica de injeção dupla-oposta (DOI, do inglês *dual-opposite injection*). As amostras de cervejas foram inicialmente desgaseificadas em banho de ultrassom, em

seguida foram centrifugadas e diluídas com a solução padrão (IS) 9:1 (v/v). O BGE foi composto por 45 mmol/L de imidazol (do inglês, *imidazole*), 50 mmol/L de ácido fórmico (do inglês, *formic acid*) e 5% de metanol (do inglês, *methanol*), em pH 4,6. O capilar utilizado foi de sílica fundida, com revestimento, com comprimento total de 60 cm, o comprimento efetivo foi de 51,5 cm para cátions e 8,5 ânions, e 75 µm de i.d. A voltagem foi de 15 kV e o tempo de análise foi de 8 minutos. Para os autores, a introdução da amostra nas duas extremidades do capilar possibilita a determinação tanto de cátions quanto de ânions em uma mesma análise e em um curto período de tempo. Entretanto, apesar dos autores terem obtido bons resultados, conseguiram quantificar apenas 3 AOA (lático, pirúvico e succínico) devido, provavelmente, a interferência de outros componentes da matriz. Os autores também identificaram os ácidos tartárico, sórbico, ascórbico e butírico como possíveis interferentes na análise de cerveja.

As concentrações dos AOA encontrados por esses autores (Tabela 3) variaram nas diferentes cervejas, demonstrando que esses compostos estão relacionados, principalmente, com a matéria-prima presente no mosto e com o processo fermentativo. Na Figura 8 pode-se observar a diferença entre as concentrações mínima e máxima encontradas por esses autores nas diferentes amostras de cervejas. Para esse gráfico excluiu-se as concentrações referentes às amostras da cerveja estilo Catharina Sour, pois iria dificultar a visualização devido à grande diferença entre as concentrações encontradas nesse estilo de cerveja.

Figura 8 – Concentração de AOA em cervejas tradicionais.



Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2023).

Como observado na Tabela 3, as análises realizadas por Pérez-Ruiz et al. (2004), Santalad et al. (2007), Fang (2015), Liu et al. (2017) e Das et al. (2019) não identificaram o ácido pirúvico nas amostras, segundo os autores, devido a sobreposição do pico com outro composto desconhecido presente na cerveja. Cortacero-Ramírez et al. (2005) identificou esse mesmo ácido apenas em amostras de cerveja sem álcool. Além do ácido pirúvico, o ácido cítrico também apresentou sobreposição nas análises realizadas por Ugalde et al., (2022), Kozaki et al., (2019), Das et al. (2019), Erny et al. (2009) e Cortacero-Ramírez et al. (2005), no entanto, Erny et al. (2009) corrigiu esse problema aumentando a força iônica do tampão utilizado na análise por CE-DAD.

Cortacero-Ramírez et al. (2005) e Klampf (1999) analisaram cerveja sem álcool e observaram menores concentrações desses AOA, provavelmente devido ao processamento realizado para reduzir o teor alcoólico, como a fermentação interrompida e o uso de levedura com baixo grau de fermentação que reduzem o tempo do processo e consequentemente o teor de AOA na bebida.

Hong & Fang (2015) analisaram as alterações dos ácidos láctico, acético, cítrico, málico, succínico e fórmico em diferentes mostos com e sem adição de adjuntos cervejeiros e observaram que quando o arroz foi utilizado como adjunto, o ácido acético foi predominante, correspondendo a mais de 40% do total. No entanto, a contribuição do malte para o teor total de ácidos orgânicos ainda foi mais relevante, indicando que o malte é a principal fonte desses ácidos no mosto. Além disso, os autores observaram que após o processo fermentativo as concentrações desses ácidos aumentaram, especialmente dos ácidos succínico, láctico e acético. Os autores também classificaram os ácidos orgânicos em três grupos, sendo o primeiro constituído pelos ácidos cítrico, málico, fumárico e fórmico que não apresentaram nenhum ou pouco aumento após a fermentação, o segundo é composto pelos ácidos láctico e acético que já estavam presente no mosto em uma concentração que não era baixa, mas que aumentaram após a fermentação, e por último o grupo constituído pelo ácido succínico que estava presente no mosto em menor concentração, mas que após a fermentação aumentou significativamente.

Coote & Kirsop (1974) e Devries (1993) analisaram ácidos orgânicos em diferentes etapas do processamento da cerveja e também observaram que os teores dos ácidos pirúvico, málico, succínico e láctico aumentaram durante a fermentação. Os autores notaram que o ácido

piruvato era excretado inicialmente durante o período de crescimento da levedura e que a redução desse crescimento leva ao aumento do teor de acetato. Esse resultado demonstra que os níveis de piruvato e acetato variavam inversamente durante a fermentação, sugerindo que o piruvato é convertido em acetato pela levedura. Além disso, observaram que diferentes cepas de leveduras podem levar a diferentes teores de lactato e que o ácido cítrico reduz a sua concentração nos primeiros dias da fermentação, mas que a partir do quarto dia aumenta, contudo, esse ácido e o ácido málico mantêm as suas concentrações durante a maturação da bebida.

O malte é a principal fonte de AOA no mosto, e South (1996) observou que os ácidos orgânicos no malte da cevada são produzidos principalmente durante a germinação. Além disso, observou que os níveis do ácido lático e málico no malte são influenciados pelos processos de moagem e secagem, sendo o ácido lático derivado principalmente do malte, com pouca produção durante a mosturação.

Contudo, essa afirmação não inclui as cervejas *sours*, visto que a concentração do ácido lático aumenta consideravelmente após a fermentação láctica. Essa afirmação pode ser comprovada pelo estudo realizado por Ghesti et al., 2023, que estudaram uma nova fonte de *Lactobacillus* a partir da *Frieseomelitta varia*, uma abelha brasileira sem ferrão do bioma Cerrado, para a produção da Catharina Sour com adição de manga e maracujá. Esses autores prepararam duas amostras, uma contendo *Lactobacillus* vivo (LCS - Yakult) e a outra com *Frieseomelitta varia pollen* (CSP). Após as análises, os autores identificaram 4 (quatro) ácidos orgânicos na cerveja pronta, o ácido acético com 1870 mg/L (LCS) e 1220 mg/L (CSP), succínico com 7340 mg/L (LCS) e 6210 mg/L (CSP), cítrico com 3020 mg/L (LCS) e 3800 mg/L (CSP) e lático com 9690 mg/L (LCS) e 9990 mg/L (CSP). As concentrações encontradas por esses autores estão superiores as das cervejas tradicionais, Figura 9, para todos os ácidos analisados, demonstrando que as cervejas *sours* podem se diferenciar das tradicionais a partir do seu perfil de ácidos orgânicos.

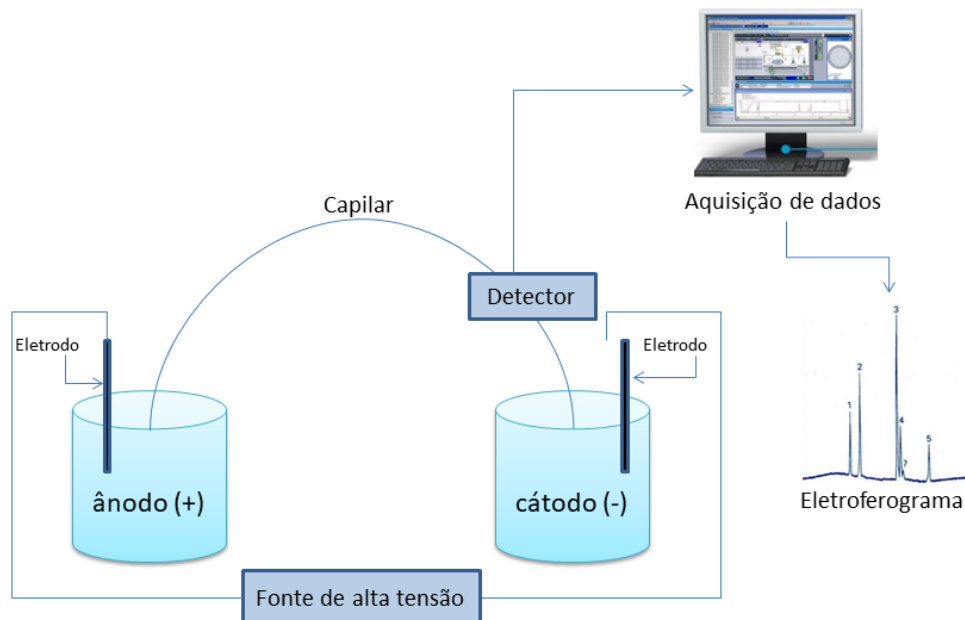
2.5 ELETROFORESE CAPILAR

2.5.1 Contextualização e Instrumentação

A eletroforese capilar (CE) é uma técnica de separação por eletromigração (TAVARES, 1995; TORAÑO; RAMAUTAR; DE JONG, 2019) que pode ser utilizada em distintas áreas (química, farmacêutica, alimentícia, entre outras) e matrizes (vitaminas, aminoácidos, íons inorgânicos, ácidos orgânicos, fármacos, proteínas, peptídeos, entre outros). É baseada na capacidade de migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em capilares através de um meio condutor (BGE) (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997), a partir de um campo elétrico aplicado entre um ânodo e um cátodo (WHATLEY, 2001; ANDERSON et al., 2019).

A instrumentação da CE é bem simples, consistindo basicamente de uma fonte de alta tensão, capilar, eletrodos, detector e um sistema para aquisição de dados. Os equipamentos mais modernos de CE são equipados com um sistema de refrigeração que passa através do cartucho, onde fica armazenado o capilar (TAVARES, 1995). Na Figura 9 está apresentada uma representação de um sistema típico de eletroforese capilar.

Figura 9 – Representação esquemática de um sistema típico de eletroforese capilar.

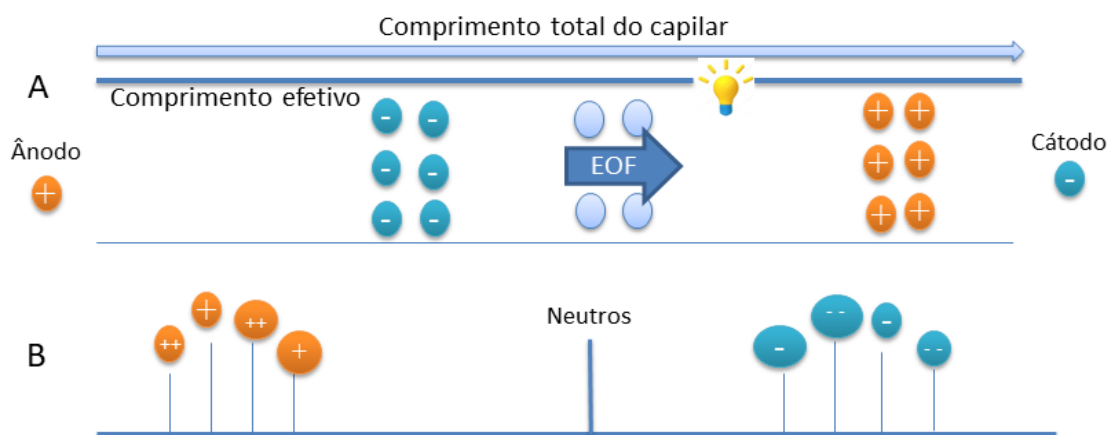


Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2023).

A fonte de alta tensão, com voltagem no intervalo de 0 a 30 kV, é conectada através de dois eletrodos, normalmente de platina, aos dois reservatórios (*inlet* e *outlet*) contendo a solução de eletrólito condutor (BGE, do inglês *background electrolyte*). Os capilares, normalmente de sílica fundida, são preenchidos com o BGE e imersos nos dois reservatórios, completando o sistema. Quando a amostra é injetada (método eletrocínético ou hidrodinâmico) no capilar e aplica-se o campo elétrico, os analitos migram com direção e velocidade determinadas pela razão massa/carga, passando pela janela do detector, os dados obtidos são armazenados e processados para a emissão do eletroferograma (TAVARES, 1995; WHATLEY, 2001; PAPETTI; COLOMBO, 2019).

A eletroforese capilar de zona (CZE) é um dos métodos de separação eletroforética mais usados. Nessa análise o capilar é preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes, (TAVARES, 1995) e quando aplicado um campo elétrico, são formadas zonas que migram independentemente, ocorrendo à separação com base em sua razão carga-tamanho (TORAÑO; RAMAUTAR; DE JONG, 2019), como representado na Figura 10, indo da esquerda para a direita, iniciando com a saída dos cátions pequenos e de maior carga, pois apresentam alta mobilidade, seguido pela saída do fluxo junto com os neutros e por último os ânions grandes e de menor carga que apresentam menor resistência ao fluxo (PAPETTI; COLOMBO, 2019).

Figura 10 – Representação esquemática da separação por eletroforese capilar de zona (A) e a separação baseada na relação carga-tamanho (B).



Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2023).

A análise de CZE pode ser realizada no modo direto quando o composto analisado absorve na região do UV-Vis ou de modo indireto, quando esse composto não absorve e é necessário à adição de um agente cromóforo ao BGE, nesse caso, tanto os analitos que absorvem na região do UV-Vis quanto os que não absorvem serão detectados (WHATLEY, 2001).

Como a maioria dos solutos aniônicos de baixa massa molar, como os ácidos orgânicos alifáticos (AOA), não exibem sinal detectável na região do UV/Vis, é necessário à adição de um cromóforo aniônico no BGE. Esse cromóforo deve ter a mesma carga que o analito para no momento em que passar pelo detector, o sinal ser deslocado e um pico negativo (*background*) ser registrado no eletroferograma, o sinal do pico pode ser invertido (positivo) no próprio equipamento para obter o eletroferograma tradicional (COLOMBARA; TAVARES; MASSARO, 1997).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E PADRÕES ANALÍTICOS

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico (pureza > 95%) e água ultrapurificada obtida usando um sistema Milli-Q® (Millipore, Bedford, MA, EUA).

Os padrões dos ácidos oxálico, pirúvico, maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, glucônico, glutárico, succínico, acético, propiônico, ftálico e trifluoroacético, bem como TRIS (do inglês, *hydroxymethyl aminomethane*) e CTAB (do inglês, *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, CO, E.U.A.), e o hidróxido de sódio (NaOH), utilizado para condicionamento do capilar, foi adquirido da marca Neon (São Paulo, SP, Brasil).

3.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES

Os padrões dos ácidos oxálico, pirúvico, maleico, malônico, fumárico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, glicólico, láctico, glucônico, glutárico, succínico, acético e propiônico foram preparados em solução aquosa na concentração de 100 mmol L⁻¹ e armazenados a 4 ± 2 °C até o momento das análises. Para a construção da curva de calibração foi retirada uma alíquota de cada solução padrão para o preparo do mix 1, contendo os 16 ácidos orgânicos.

Posteriormente foi preparado o mix 2 e, em seguida, foram realizadas diluições em sete níveis de diferentes concentrações, como apresentado na Tabela 4.

O BGE foi preparado diariamente, sendo composto por ácido ftálico 20 mmol L⁻¹, TRIS 16,0 mmol L⁻¹ e CTAB 0,8 mmol L⁻¹, em pH 3,3. O ácido trifluoroacético (do inglês, *Trifluoroacetic acid* - TFA) foi utilizado como padrão interno (I.S, do inglês *internal standard*).

Tabela 7 – Concentrações dos ácidos orgânicos alifáticos em cada nível da curva de calibração.

AOA	Níveis (mg L ⁻¹)						
	1	2	3	4	5	6	7
Maleico	2,84	5,69	11,4	22,8	34,1	45,5	56,9
Malônico	2,55	5,10	10,2	20,4	30,6	40,8	51,0
Tartárico	3,68	7,36	14,7	29,4	44,1	58,9	73,6
Fórmico	1,13	2,26	4,5	9,02	13,5	18,1	22,6
Cítrico	4,71	9,42	18,8	37,7	56,5	75,3	94,2
Málico	3,29	6,57	13,2	26,3	39,4	52,6	65,7
Succínico	2,89	5,79	11,6	23,2	34,7	46,3	57,9
Acético	1,47	2,94	5,89	11,8	17,7	23,6	29,4
Glucônico	5,35	10,69	21,4	42,8	64,2	85,6	107
Glutárico	3,24	6,48	13,0	25,9	38,9	51,8	64,8
Propiônico	1,82	3,63	7,26	14,5	21,8	29,1	36,3
Glicólico	1,86	3,73	7,46	14,9	22,4	29,8	37,3
Fumárico	2,84	5,69	11,4	22,8	34,1	45,5	56,9
Lático	2,21	4,42	8,83	17,7	26,5	35,3	44,2
Pirúvico	2,16	4,32	8,63	17,3	25,9	34,5	43,2
Oxálico	2,21	4,41	8,83	17,6	26,5	35,3	44,1

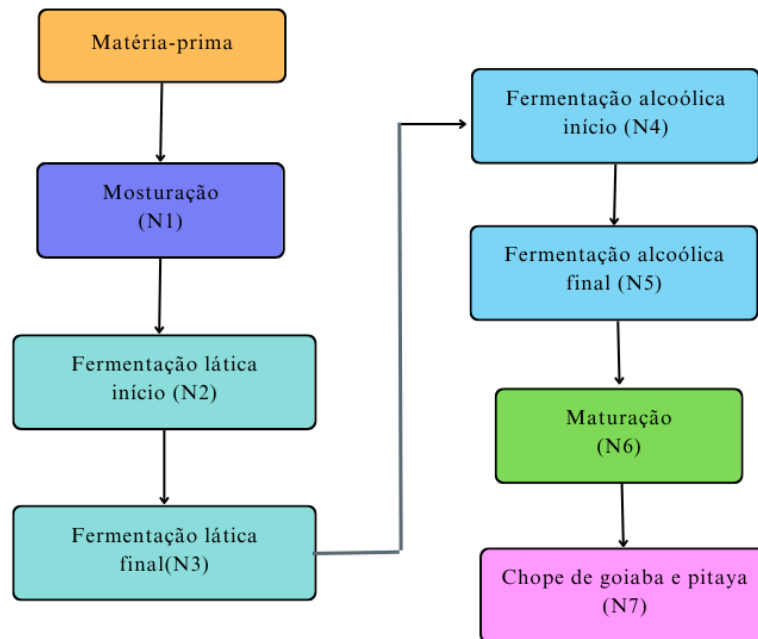
Legenda: Ácidos orgânicos alifáticos (AOA). Fonte: Próprio autor.

3.3 AMOSTRAGEM

As amostras de cerveja Catharina Sour foram adquiridas no comércio local da cidade de Florianópolis-SC e mantidas em temperatura ambiente até o momento das análises. As amostras provenientes das etapas de mosturação, fermentação e maturação foram adquiridas de uma cervejaria local e da produção em escala laboratorial, desenvolvida no Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, essas amostras foram armazenadas sob congelamento (-18 °C) até o momento das análises.

Para a produção do chope da cervejaria artesanal foi utilizado 42,86% de malte de trigo e 57,14% de malte de pilsen, os quais foram misturados com água (BRASIL, 2011c; BRASIL, 2019) para o início da etapa de mosturação, após essa etapa, esse mosto foi filtrado e em seguida mantido em fervura por 10 minutos para eliminação de microrganismos. Em seguida esse mosto foi resfriado até aproximadamente de 37 °C para o início da fermentação láctica com a adição do *Lentilactobacillus buchneri*, essa etapa é acompanhada até chegar ao pH de 3,5. Posteriormente, esse mosto foi submetido à temperatura para finalização dessa etapa de fermentação, durante essa fervura também foi adicionado o lúpulo (máximo de 5 IBU) e, em seguida, foi realizado o resfriamento (temperatura máxima de 25°C) e a inoculação da levedura *Ale (S. cerevisiae)* para a fermentação alcoólica. Após essa etapa de fermentação, deu-se início a etapa de maturação. Durante essa etapa foram adicionadas as polpas de goiaba (*Psidium guajava*) e pitaya (*Hylocereus polyrhizus*), na relação 50% -50%, após a maturação a cerveja foi submetida à etapa de clarificação, seguida da carbonatação e envase em barril de cerveja. As amostras analisadas foram coletadas de acordo com a Figura 11, nas etapas de N1 a N7.

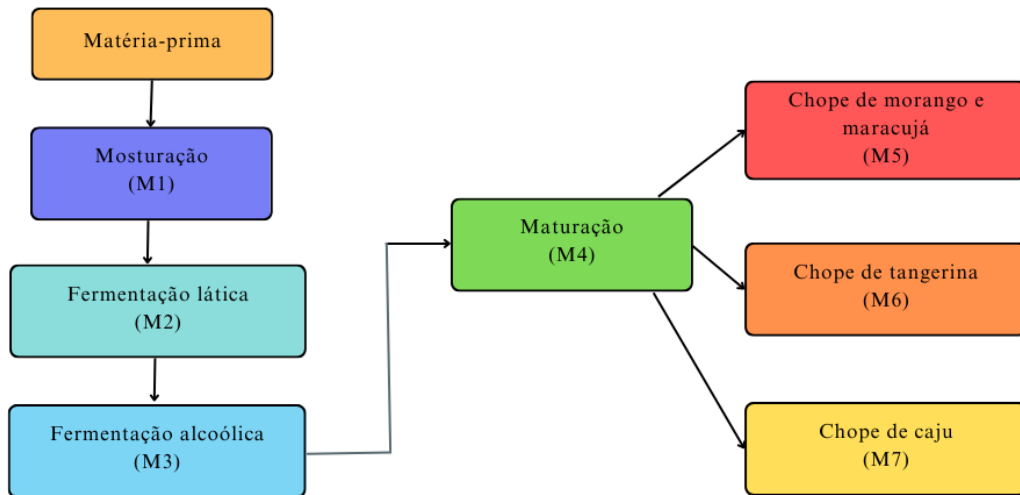
Figura 11 - Fluxograma da coleta das amostras da cervejaria artesanal.



Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2023).

Para a produção do chope em escala laboratorial foi realizado o mesmo procedimento, contudo, as porcentagens do malte variaram, sendo 50% de malte de trigo e 50% de malte de pilsen, além disso, foi utilizado o *Lactiplantibacillus plantarum* para a fermentação láctica. Após a fermentação alcoólica o mosto foi dividido em três tanques de maturação para a dição das polpas de frutas, sendo o primeiro adicionado de morango (*Fragaria x ananassa Duch.*) e maracujá (*Passiflora edulis*); o segundo de tangerina (*Citrus reticulata*) e o terceiro de caju (*Anacardium occidentale*). Na Figura 12 estão representadas as etapas (M1 a M7) em que foram realizadas as coletas das amostras.

Figura 12 - Fluxograma da coleta das amostras em escala laboratorial.



Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2023).

Embora a Catharina Sour seja o primeiro estilo brasileiro a ser reconhecido internacionalmente, poucas amostras comerciais estão disponíveis no mercado, desse modo, apenas 5 amostras foram encontradas no comércio local da cidade de Florianópolis/SC. Essas amostras eram provenientes de duas cervejarias, sendo duas amostras da primeira cervejaria, codificadas como A1- cerveja de abacaxi e hortelã e A2- cerveja de uva e gengibre, comercializadas em garrafas de vidro de 500ml. Para a segunda cervejaria foram adquiridas 3 amostras, codificadas como B3- cerveja de jabuticaba, B4 cerveja de framboesa e B5- cerveja de uva Goethe, comercializadas em garrafas de vidro de 355ml, totalizando 5 amostras de cervejas comerciais de Catharina Sour.

3.4 PREPARO DE AMOSTRAS

O preparo das amostras (codificadas) teve início com a transferência das cervejas comerciais e das amostras das etapas de produção para tubos de polipropileno com capacidade para 15 mL, em seguida esses tubos foram submetidos a banho de ultrassom por 20 min, para desgaseificação.

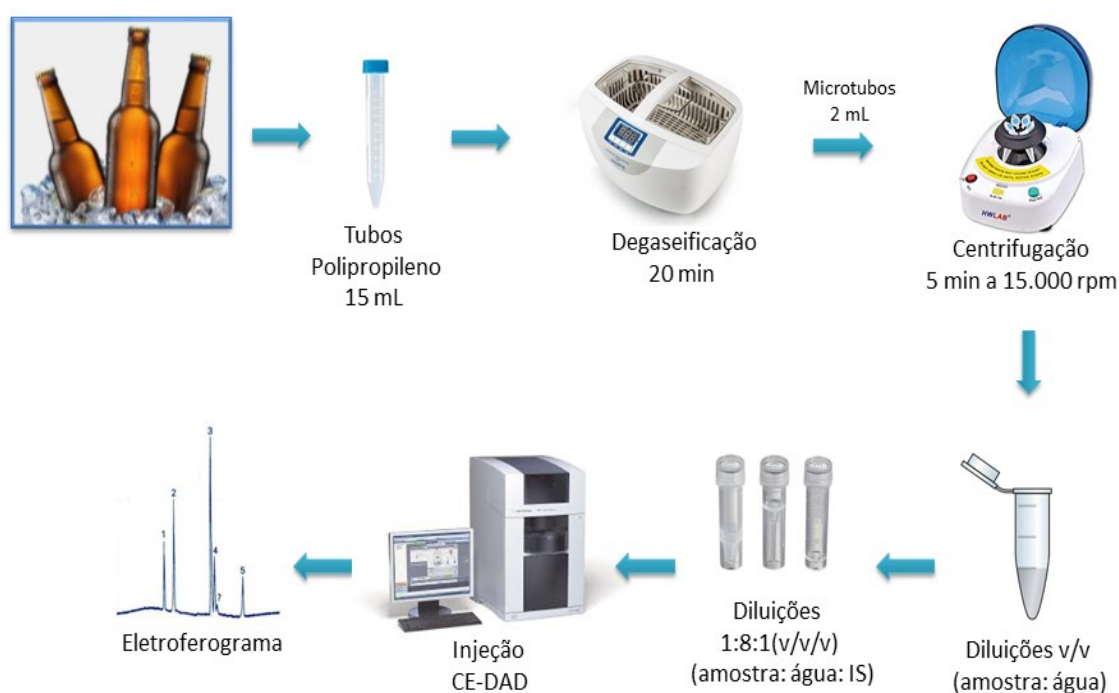
Após essa etapa, essas amostras foram transferidas para microtubos (eppendorf) de polipropileno com capacidade para 2 mL e centrifugadas por 10 min a 15.000 rpm.

Em seguida foram realizadas as análises a fim de avaliar as concentrações prévias de cada analito, considerando a equivalência dos sinais dos padrões na curva de calibração e seus

limites de quantificação e detecção. Avaliadas as concentrações prévias, as amostras foram diluídas com água ultrapura em dois grupos distintos, considerando o perfil de AOA.

Na sequência, foram preparados frascos para injeção, contendo as respectivas diluições das amostras e padrão interno (I.S), na proporção de 1:8:1(v/v/v) (amostra: água: IS) para posterior injeção no sistema de CE, como representado na Figura 13.

Figura 13 – Representação esquemática do preparo da amostra para a análise em CE.



Fonte: Elaborado pela autora deste trabalho (2023).

3.5 INSTRUMENTAL E CONDIÇÕES ANALÍTICAS

A determinação dos AOA nas amostras foi realizada utilizando o método desenvolvido por Brugnerotto et al., (2019), com as seguintes modificações: composição do BGE (ácido fítico 20 mmol.L^{-1} , CTAB $0,8 \text{ mmol.L}^{-1}$, e TRIS 16 mmol.L^{-1}), capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com comprimento total de 74 cm (L_{tot}), sendo 65,5 cm comprimento efetivo (L_{eff}) e 75 μm de diâmetro interno (d.i.). As separações foram realizadas com injeção hidrodinâmica de 50 mbar por 3 segundos, tensão de 15 kV, modo de detecção indireto em 240 nm, e temperatura mantida a 20 °C.

Os experimentos para determinação de AOA nas amostras foram realizados em um sistema de eletroforese capilar, modelo 7100 da marca *Agilent Technologies* (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos (CE-DAD), com sistema de refrigeração por circulação de ar para controle da temperatura e *software* HP *ChemStation*® para aquisição e tratamento dos dados.

Antes do início das análises o capilar foi previamente condicionado com NaOH 1,0 mol/L por 15 min, seguido de lavagem com água ultrapurificada por 15 min e BGE por 30 min. Também foram realizadas lavagens entre corridas, para assegurar a estabilidade do capilar e garantir a reprodutibilidade da análise, essa lavagem é realizada pelo próprio equipamento e o método utilizado considerou lavagem de 2min com o BGE. Ao final dos ciclos o capilar foi lavado com solução de NaOH 1,0 mol/L por 15 min, seguida de água ultrapura por 15 min.

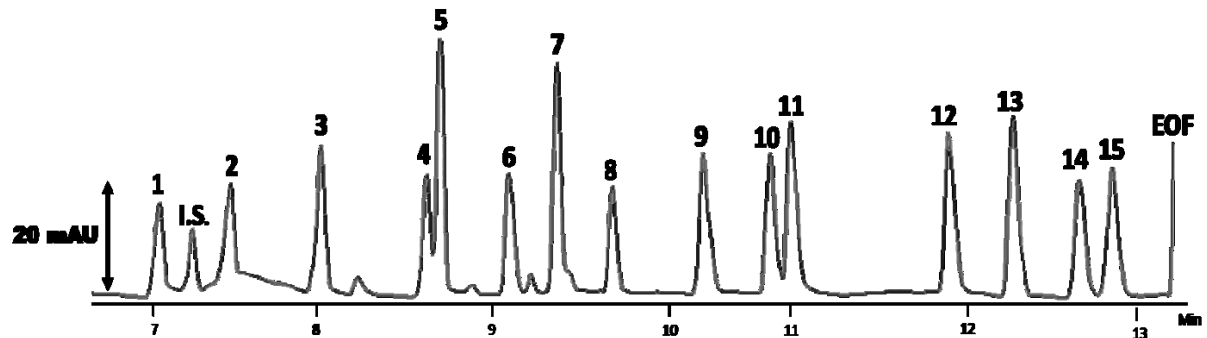
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O preparo das amostras e as análises foram realizadas em triplicatas e os resultados expressos como média \pm desvio padrão (DP). Para identificar diferenças significativas entre as médias, foram feitas as análises de variância (ANOVA) e o teste de *Tukey*, onde diferenças entre as médias no nível de 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significativas. O tratamento dos dados foi conduzido empregando os *softwares* *Microsoft Excel* (versão 2016) e *Minitab 19* (Minitab, LLC., Pensilvânia, EUA). As figuras foram elaboradas utilizando o *GraphPad Prism 9,5* (Solvusoft Corporation, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas análises dos analitos, em curva padrão, estão representados na Figura 14. Com esse resultado, pode-se observar que, dos 16 ácidos orgânicos analisados, apenas o ácido pirúvico não foi determinado pelo método utilizado, Brugnerotto et al., 2019 (modificado). Esse fato é devido à co-migração parcial, entre o pico desse ácido com o ácido maleico, como demonstrado na Figura 14, onde pode-se observar que na base do pico 2 há uma sobreposição com um alargamento da cauda entre os picos 2 e 3, demonstrando essa co-migração entre esses dois picos.

Figura 14 – Eletroferograma da separação dos padrões dos AOA.



Legenda: 1- ácido oxálico; I.S.- ácido trifluoroacético; 2- ácido maleico; 3- ácido malônico; 4- ácido fumárico; 5- ácido tartárico; 6- ácido fórmico; 7- ácido cítrico; 8- ácido málico; 9- ácido glicólico; 10- ácido láctico; 11- ácido glucônico; 12- ácido succínico; 13- ácido glutárico; 14- ácido acético; 15- ácido propiônico; EOF- fluxo eletrosmótico. Fonte: Próprio autor (2023).

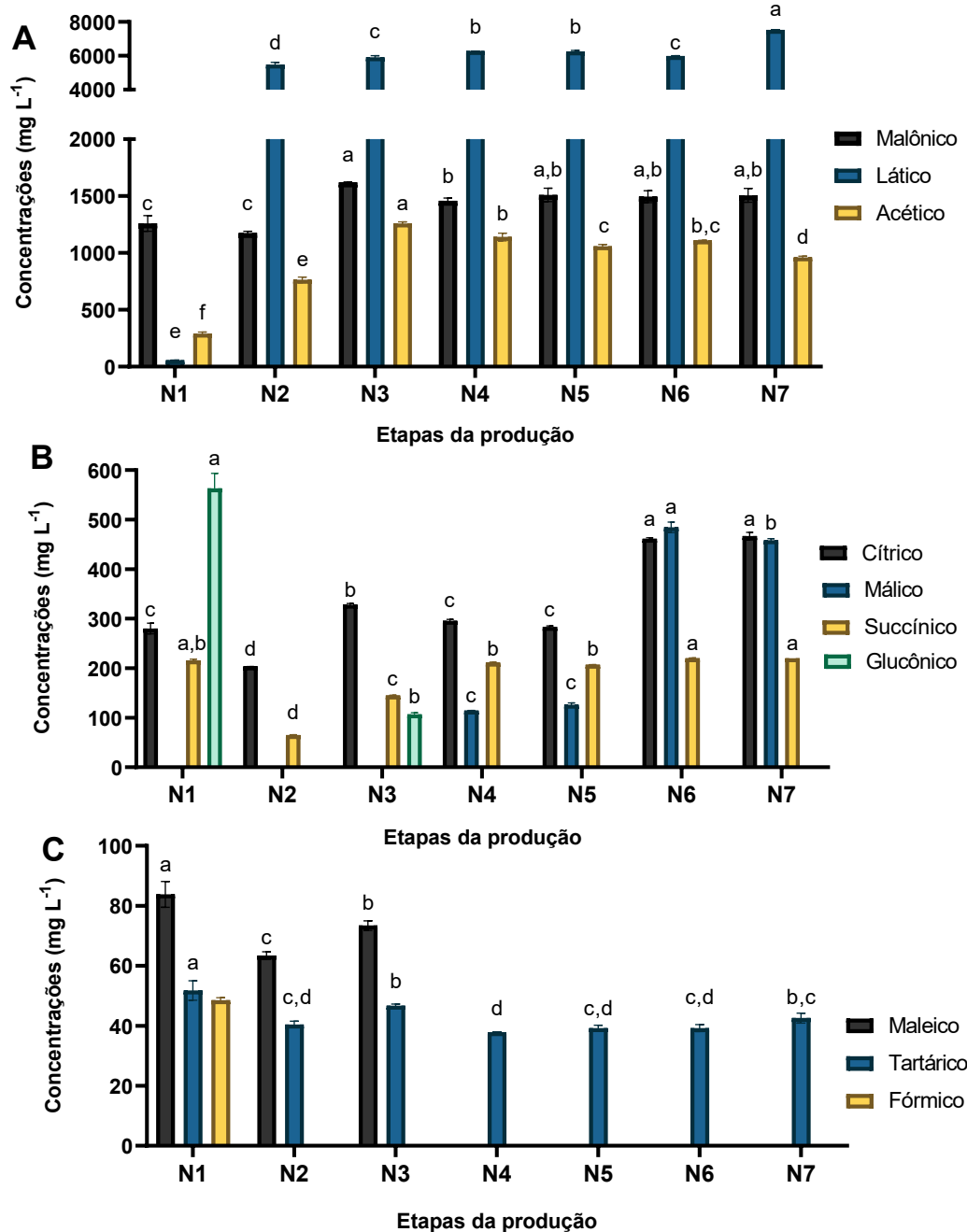
Os resultados para a análise em matriz demonstraram que dos 15 ácidos orgânicos avaliados, apenas os ácidos oxálico, glicólico, glutárico e propiônico não foram detectados nas amostras estudadas. Esses resultados estão de acordo com Ghesti et al., (2023) que também não identificaram esses ácidos nas amostras de Catharina Sour analisadas. Contudo, devido à complexidade da matriz e a escassez de estudos científico que tenham realizado essa análise em cervejas desse estilo, são necessários mais estudos para confirmar se esses ácidos não estão presente nesse estilo de cerveja.

4.1 PRODUÇÃO ARTESANAL DE CERVEJA ESTILO CATHARINA SOUR: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS (AOA).

Os resultados da determinação dos AOA, nas amostras obtidas durante as etapas da produção artesanal do chope estilo Catharina Sour, podem ser consultados na tabela do Apêndice A.

Analisando os resultados, foi observado que os ácidos maleico, malônico, tartárico, fórmico, cítrico, málico, láctico, glucônico, succínico e acético foram identificados em diferentes concentrações, sendo que de todos, apenas os ácidos maleico, fórmico, málico e glucônico não foram detectados em todas as etapas de produção, como demonstrado na Figura 15.

Figura 15 - Ácidos orgânicos alifáticos (AOA) presentes nas diferentes etapas da produção artesanal do chope estilo Catharina Sour. Sendo (A) AOA de maiores concentrações nas amostras, (B) AOA de concentrações intermediárias e (C) AOA de menores concentrações nas amostras.



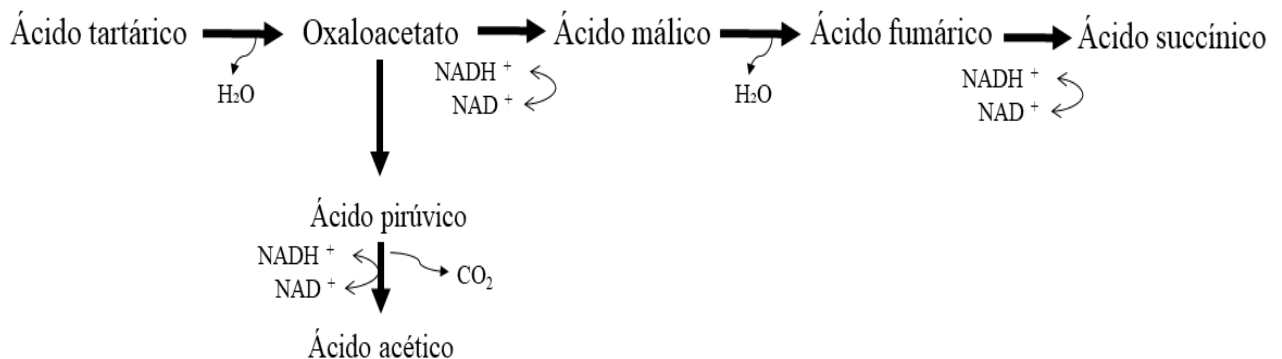
Legenda: N1- mosto; N2- início da fermentação láctica; N3- final da fermentação láctica; N4- início da fermentação alcoólica; N5- final da fermentação alcoólica; N6- maturação; N7- chope de goiaba e pitaya. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Fonte: Próprio autor (2023).

Ainda, de acordo com a Figura 15 (A), foi possível perceber que o ácido láctico foi o ácido predominante nas amostras, seguido dos ácidos malônico e acético. Além disso, na Figura 15 (B) é possível observar os ácidos cítrico, málico e succínico que apresentaram diferença significativa entre as duas etapas de fermentação e na Figura 15 (C) pode-se observar os ácidos que apresentaram as menores concentrações nas amostras.

A partir da Figura 15 e da tabela do Apêndice A, foi observado que as concentrações do ácido tartárico apresentaram diferença significativa entre as etapas de mosturação, fermentação láctica e alcoólica. Essas concentrações variaram de $51,8 \pm 3,24 \text{ mg L}^{-1}$ na etapa de mosturação, $46,7 \pm 0,55 \text{ mg L}^{-1}$ na etapa de fermentação láctica, $39,3 \pm 1,07 \text{ mg L}^{-1}$ na etapa de fermentação alcoólica e $42,6 \pm 1,65 \text{ mg L}^{-1}$ no produto final. Esses resultados demonstram a possível degradação desse ácido durante a produção da cerveja, visto que sua concentração inicial no mosto é maior que a encontrada no produto final. Essa degradação pode ocorrer devido ao metabolismo de algumas bactérias lácticas (BAL) heterofermentativas que desidratam o ácido tartárico em oxaloacetato, através da enzima tartarato desidratase, posteriormente uma parte é convertida em ácido succínico e outra parte em ácido acético e dióxido de carbono, como demonstrado na Figura 16 (FLEET, 1993). Além disso, após a adição das polpas de goiaba e pitaya esse ácido apresentou um pequeno aumento (significativo) em sua concentração. O ácido tartárico pode apresentar concentrações entre 0,788 - 6mg/100g nas goiabas, demonstrando que a adição dessa fruta pode ter contribuído para a sua concentração no produto final (MEDINA & PAGANO, 2003; CARDOSO et al., 2021; CHAN et al., 2022).

Figura 16 - Via de degradação do ácido tartárico por BAL heterofermentativas.



Fonte: Adaptado de Fleet (1993).

O ácido maleico foi detectado e quantificado apenas nas etapas de mosturação ($83,8 \pm 4,33 \text{ mg L}^{-1}$) e fermentação láctica, início ($63,4 \pm 1,27 \text{ mg L}^{-1}$) e final ($73,4 \pm 1,58 \text{ mg L}^{-1}$), apresentando diferença significativa entre essas duas etapas da produção (Figura 15 C). Este resultado demonstra que esse ácido não é produzido durante a fermentação alcoólica e que sua concentração é determinada principalmente pela sua concentração inicial do mosto (COOTE; KIRSOP, 1974; XIANG, 2006; ANDERSON et al., 2019). Esse resultado também supõe que esse ácido, provavelmente, é utilizado durante o metabolismo da levedura, contudo, são necessários mais estudos para comprovar essa afirmação.

Semelhante ao comportamento do ácido maleico, o resultado observado para o ácido fórmico ($48,5 \pm 0,90 \text{ mg L}^{-1}$) indica que este origina-se a partir do malte e no decorrer da etapa de fermentação foi degradado pela ação das bactérias lácticas (Figura 15 C). Klampf (1999) analisando cervejas de trigo, arroz e sem álcool, quantificou o ácido fórmico, contudo, quando o autor analisou cervejas tipo pilsen, esse ácido não foi encontrado. Uzhel et al., (2021) também quantificou o ácido fórmico ao analisar cervejas *light*, entretanto, os autores não especificaram qual a cerveja analisada ou quais os ingredientes presentes nessa cerveja (adjuntos cervejeiros) para identificação da possível origem desse ácido nessas amostras. Além desses, outros autores analisaram a presença desse ácido em amostras de mostos, como os autores Xiang (2006), South (1996) e Soga & Wakaura (1997), que não identificaram o ácido fórmico na composição de mostos produzidos exclusivamente por malte de cevada, no entanto, Hong & Fang (2015), analisando amostras de mostos com adição de adjuntos (cereais maltados ou não), identificaram esse ácido. Esses resultados corroboram com o resultado obtido nesse estudo, visto que a Catharina Sour foi produzida por uma mistura entre malte de trigo e cevada, desse modo, a origem do ácido fórmico nessa cerveja seja, provavelmente, oriunda do malte de trigo.

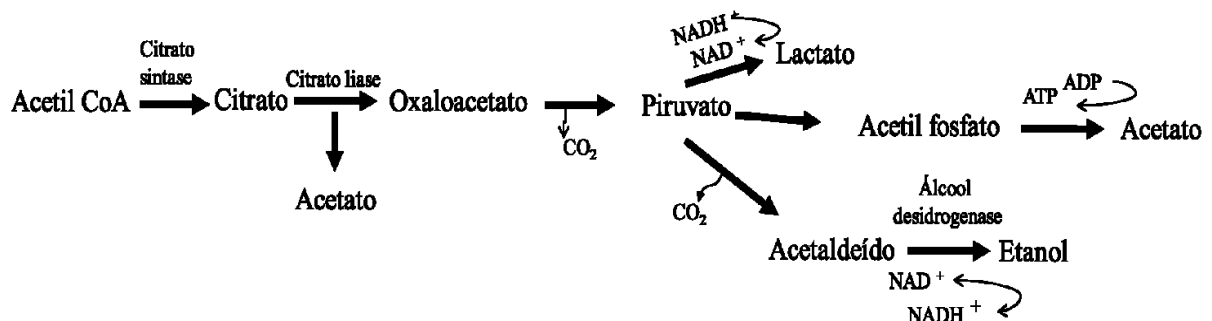
Assim como os ácidos maleico e fórmico, o ácido glucônico (Figura 15 B) apresentou a sua maior concentração na etapa de mosturação ($563,3 \pm 30,1 \text{ mg L}^{-1}$), demonstrando ser oriundo da matéria-prima utilizada para a elaboração desse mosto. Esse ácido não foi quantificado no início da fermentação láctica, sendo quantificado apenas ao final da fermentação ($108,6 \pm 6,36 \text{ mg L}^{-1}$). Do mesmo modo que o ácido maleico, após a fermentação láctica esse ácido não foi mais quantificado, esse resultado supõe que as leveduras utilizaram esse ácido durante o seu metabolismo, contudo, não foi encontrado na literatura estudos de como ocorre essa degradação do ácido glucônico pelas leveduras cervejeiras.

Na etapa de mosturação, o ácido malônico foi o ácido majoritário (Figura 15 A) com concentração de $1260 \pm 68,99 \text{ mg L}^{-1}$. Essa alta concentração pode ser explicada pela presença desse ácido nos grãos de trigo e pela possível produção durante o processo de maltagem, no entanto, não foram encontrados estudos que avaliavam a produção do ácido malônico durante a maltagem do trigo (CHEN, 2011). Durante o início da fermentação láctica ($1176 \pm 13,47 \text{ mg L}^{-1}$), esse ácido não sofreu alteração significativa em sua concentração, entretanto, ao final dessa fermentação, o ácido malônico apresentou a sua maior concentração ($1620 \pm 5,24 \text{ mg L}^{-1}$). Esse aumento significativo indica que esse ácido foi produzido pelo *L. buchneri* durante essa etapa. Apesar de não terem sido encontrados estudos explicando qual a via que essa BAL utiliza e qual a finalidade da produção desse ácido, sabe-se que o ácido malônico é um homólogo do ácido succínico, sendo considerado como um inibidor competitivo da succinato desidrogenase no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), devido a sua forte afinidade com a enzima do ácido succínico. Desse modo, algumas bactérias utilizam esse mecanismo para interromper o ciclo TCA durante a fermentação ou devido a períodos de estresse. Além disso, sua produção pode estar vinculada a formação da malonil-CoA que participa da síntese de novos ou aumento das cadeias de ácidos graxos, além de participar da formação de flavonóides, isoflavonóides e vários compostos malonilados (CHEN, 2011; PARK et al., 2018; BOWMAN & WOLFGANG, 2019). Na sequência, durante o início da fermentação alcoólica, a concentração reduziu ($1460 \pm 22,88 \text{ mg L}^{-1}$), aumentando no final da fermentação ($1511 \pm 58,87 \text{ mg L}^{-1}$) e se mantendo constante (estatisticamente) até o produto final ($1506 \pm 60,63 \text{ mg L}^{-1}$).

Ainda na Figura 15 (B), pode-se observar que o ácido cítrico apresentou concentração de $280 \pm 10,8 \text{ mg L}^{-1}$, na etapa de mosturação, demonstrando que estava presente na matéria-prima utilizada. Na etapa seguinte, esse ácido sofreu redução significativa no início da fermentação láctica ($203,1 \pm 0,35 \text{ mg L}^{-1}$), aumentando no final dessa fermentação ($328,1 \pm 2,48 \text{ mg L}^{-1}$). Durante a fermentação alcoólica, esse ácido não apresentou diferença significativa entre o início ($295 \pm 3,19 \text{ mg L}^{-1}$) e final da fermentação ($284,4 \pm 2,32 \text{ mg L}^{-1}$), contudo, durante a maturação ($454 \pm 14,2 \text{ mg L}^{-1}$) esse ácido aumentou significativamente e se manteve constante (estatisticamente) até o produto final ($467 \pm 7,81 \text{ mg L}^{-1}$). O ácido cítrico desempenha um papel importante nos processos bioquímicos que ocorrem durante essas etapas, podendo ser degradado e sintetizado ao longo dessas fermentações (HONG; FANG, 2015; CHIDI et al., 2018), o que pode justificar essa variação entre as concentrações

inicias e finais durante a fermentação láctica. Entretanto, como mencionado anteriormente, durante a fermentação alcoólica a variação da concentração não foi significativa, esse resultado pode significar que as coletas foram realizadas em momentos similares (relação síntese e degradação), desse modo, seria necessário acompanhar e realizar coletas de todo o processo fermentativo para verificar em quais períodos ocorrem variações na concentração desse ácido. Um estudo similar foi realizado por Coote & Kirsop (1974) e Devries (1993) que observaram que o ácido cítrico reduz a sua concentração nos primeiros dias da fermentação alcoólica, mas que após o 4º dia, a concentração aumenta e se mantém constante durante a maturação da cerveja. O ácido cítrico é sintetizado, principalmente, pela citrato sintase (via oxidativa do ciclo TCA) e degradado pela citrato liase, como demonstrado na Figura 17. Diferentemente dos autores citados acima, durante a maturação, a concentração do ácido cítrico aumentou significativamente, esse resultado se deve a adição das polpas de goiaba e pitaya que apresentam o ácido cítrico em sua composição. A goiaba é a principal contribuinte, apresentando concentrações entre 159 – 532 mg/100g (MUÑOZ-ARRIETA, 2021; CARDOSO et al., 2021; XIE et al., 2022).

Figura 17 - Vias de síntese e degradação do ácido cítrico.

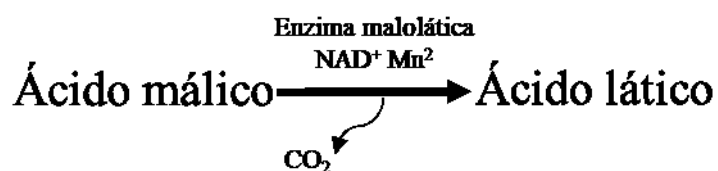


Fonte: Adaptado de Hahn-Hagerdal et al. (1994) e De Klerk, (2010).

O ácido málico (Figura 15 B) não foi detectado nas etapas de mosturação e fermentação láctica ($\text{LOD} \leq 1,17 \text{ mg L}^{-1}$), esse dado inferi que esse ácido estava em baixas concentrações no malte utilizado e que não foi produzido durante a fermentação láctica. Durante o processo de maltagem (maceração e germinação), o ácido málico pode ser facilmente degradado durante o processo respiratório, além disso, esse ácido pode ser utilizado pelas BAL para a fermentação maloláctica (SOUTH, 1996; XIANG, 2006; CHIDI et

al., 2018; MENDES & MENDES-FAIA, 2020). Essa reação ocorre a partir da descarboxilação do ácido málico em ácido láctico, sendo catalisada pela enzima malolática e requerendo NAD e manganês, como representado na Figura 18. Na fermentação alcoólica, o ácido málico não apresentou diferença significativa entre o início ($114,5 \pm 0,32 \text{ mg L}^{-1}$) e final ($126 \pm 4,14 \text{ mg L}^{-1}$) da fermentação. Esse é um dado relevante, visto que, a levedura *S. cerevisiae* tem aptidão para a utilização desse ácido. Durante a fermentação, o malato é produzido, principalmente, a partir da via redutiva do ciclo TCA (Figura 7 – pág. 45), a partir da malato desidrogenase, que reduz o oxaloacetato a malato, além disso, devido à afinidade entre as fumarases e o fumarato ser maior do que pelo malato, essa reação ocorre com maior facilidade, ocasionando a excreção do malato (WHITING 1976; DE KLERK, 2010; HARRISON; ALBANESE, 2017; CHIDI et al., 2018). Desse modo, o aumento da concentração desse ácido durante a maturação ($482 \pm 13,6 \text{ mg L}^{-1}$) é justificável devido a essa reação, além disso, a adição das polpas também podem ter contribuído, pois a goiaba apresenta concentrações entre 70 - 469mg/100g e a pitaya 100 - 702 mg/100g (WU et al., 2019; MUÑOZ-ARRIETA, 2021; XIE et al., 2022; CHEN et al., 2022). Entretanto, ao final do processo, observou-se a redução da concentração ($458 \pm 3,47 \text{ mg L}^{-1}$), o que não era esperado, contudo, também foi observado o aumento da concentração do ácido láctico no produto final, indicando a possível ocorrência da fermentação malolática durante essa etapa.

Figura 18 - Fermentação malolática.



Fonte: Adaptado de Hutkins, 2006.

Como mencionado anteriormente, o ácido láctico foi o ácido predominante durante as etapas de produção, com exceção da mosturação que apresentou concentração de $56,9 \pm 0,46 \text{ mg L}^{-1}$ (Figura 15 A). Após a adição do *L. buchneri*, a concentração aumentou significativamente ($5475 \pm 136,2 \text{ mg L}^{-1}$) no início da fermentação láctica e, em seguida, no final da fermentação ($5903 \pm 104,4 \text{ mg L}^{-1}$). Esse aumento já era esperado, visto que, um dos principais produtos dessa reação é o ácido láctico (Fig. 2, pág.33). Após a adição da *S.*

cerevisiae, a concentração também aumentou significativamente ($6272 \pm 4,77 \text{ mg L}^{-1}$) no início da fermentação alcoólica e, em seguida, apresentou pouca variação (não significativa) ao final ($6248 \pm 62,8 \text{ mg L}^{-1}$). Essa baixa alteração na concentração durante a etapa de fermentação alcoólica é devido à levedura *S. cerevisiae* não apresentar a via de produção do ácido láctico tão eficiente como as bactérias lácticas, fazendo com que a sua produção seja mínima, se comparado com a fermentação láctica (MENDES & MENDES-FAIA, 2020). Esse é um dos motivos da importância da análise de AOA nesse estilo de cerveja, pois o ácido láctico pode ser considerado como um indicador das cervejas *sours*, uma vez que as cervejas de outros estilos, como apresentado na revisão bibliográfica (Figura 8 – pág. 58), apresentaram concentração máxima de 631 mg L^{-1} , nessas cervejas a concentração desse ácido é basicamente oriunda da composição do mosto (COOTE & KIRSOP, 1974; DEVRIES, 1993). Após a maturação ($5978 \pm 31,74 \text{ mg L}^{-1}$), a concentração apresentou a sua maior concentração ($7527 \pm 8,90 \text{ mg L}^{-1}$) no chope pronto, esse resultado não era esperado, visto que após a fermentação não deveria ocorrer um aumento tão significativo na concentração, contudo, como mencionado anteriormente, observou-se que a concentração do ácido málico reduziu e que a do ácido láctico aumentou. Esse resultado supõe uma possível fermentação maloláctica durante essa etapa (Figura 18), entretanto, essa reação não deveria ocorrer, visto que as polpas utilizadas eram pasteurizadas e assim não deveriam apresentar microrganismos capazes de realizar essa fermentação. Desse modo, a hipótese mais provável é que o produto final ainda apresentava resquícios da fermentação láctica e após a dição das polpas, os microrganismos utilizaram o ácido málico para a fermentação maloláctica.

O ácido succínico apresentou concentração variável durante as etapas avaliadas (Figura 15 B). No mosto, a concentração encontrada foi de $215,5 \pm 2,90 \text{ mg L}^{-1}$, em seguida, ocorreu um declínio significativo durante a etapa inicial da fermentação láctica ($64,9 \pm 0,99 \text{ mg L}^{-1}$), seguido do aumento ao final da fermentação ($145,5 \pm 2,81 \text{ mg L}^{-1}$). Após a adição da levedura, a concentração aumentou significativamente ($210 \pm 1,08 \text{ mg L}^{-1}$) no início da fermentação alcoólica, contudo, não apresentou aumento significativo ao final da fermentação ($209 \pm 3,72 \text{ mg L}^{-1}$). Do mesmo modo que os ácidos cítrico, málico e acético, o ácido succínico participa do metabolismo dos microrganismos utilizados durante a produção da cerveja (BRIGGS et al., 2004; DE KLERK, 2010; HONG; FANG, 2015; CHIDI et al., 2018; ANDERSON et al., 2019; MENDES & MENDES-FAIA, 2020), deste modo, sua oscilação durante as etapas é justificável. Na etapa de maturação ($222 \pm 3,37 \text{ mg L}^{-1}$) e no produto final

($222 \pm 3,63 \text{ mg L}^{-1}$) o ácido succínico apresentou a sua maior concentração. Como mencionado na revisão bibliográfica, o ácido succínico pode ser produzido através da via redutora do ciclo TCA (Figura 7 – pág. 45), sendo o ácido pirúvico reduzido a malato que, em seguida, perde uma molécula de água para ser convertido a fumarato que posteriormente é reduzido a succinato. Além dessa, pode ser produzido pela via oxidativa desse ciclo e também a partir do catabolismo de aminoácidos (aspartato e glutamato) (WHITING 1976; DE KLERK, 2010; CHIDI et al., 2018; MENDES & MENDES-FAIA, 2020). Assim, esse aumento durante essas etapas, provavelmente, deve-se a liberação do ácido produzido durante a fermentação, visto que o ácido succínico é produzido por muitos microrganismos pela sua ação antimicrobiana (ANDERSON et al., 2019).

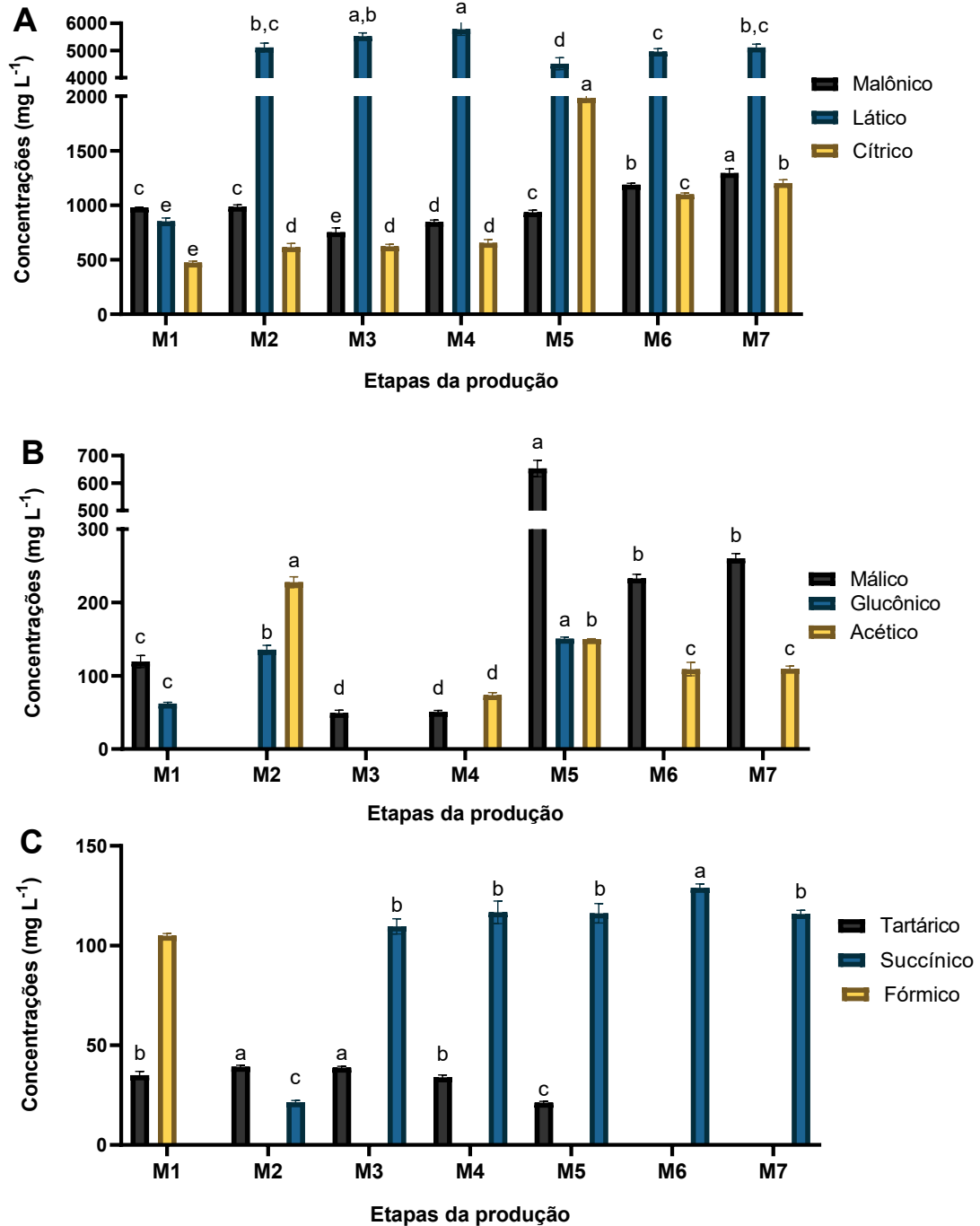
O ácido acético apresentou concentrações variadas durante o processamento (Figura 15 A), com concentração inicial de $294,3 \pm 17,2 \text{ mg L}^{-1}$ e durante o início da fermentação láctica ($9763 \pm 24,3 \text{ mg L}^{-1}$) apresentou aumento significativo, seguido da sua maior concentração no final da fermentação ($1259 \pm 14,37 \text{ mg L}^{-1}$). Esse aumento durante essa etapa já era esperado devido à utilização do *L. buchneri*, que é uma BAL heterofermentativa (HUTKINS, 2006; MENDES & MENDES-FAIA, 2020; SCHOCH et al., 2020; OBERG et al., 2022), deste modo, o ácido acético é um dos produtos finais da fermentação (Fig. 2, pág.33). Diferentemente dos ácidos cítrico, málico e succínico que também participam do metabolismo dos microrganismos (BRIGGS et al., 2004; WHITE; ZAINASHEFF, 2010; DYSVIK et al., 2020), o acético reduziu no início da fermentação alcoólica ($1140 \pm 33,99 \text{ mg L}^{-1}$) e, em seguida, teve outra redução ao final da fermentação ($1067 \pm 17,64 \text{ mg L}^{-1}$). Esse resultado pode ser devido a volatilidade desse ácido (WHITING 1976; ERASMUS et al., 2003; MENDES & MENDES-FAIA, 2020), pois após a fermentação láctica o mosto é aquecido para interromper o processo fermentativo, assim, pode ter ocorrido perdas desse ácido durante essa etapa. Além disso, o ácido acético é utilizado para a formação do Acetil-CoA (Figura 7 – pág. 45) que é utilizado na fase de crescimento exponencial. A concentração desse ácido também pode variar se a levedura for submetida a estresse osmótico, nesse caso, o acetato é utilizado como via para a regeneração do NAD^+ , que é convertido em NADH (ERASMUS et al., 2003; CHIDI et al., 2018; RICE et al., 2020). As etapas de maturação ($1109 \pm 1,58 \text{ mg L}^{-1}$) e chope pronto ($964 \pm 17,5 \text{ mg L}^{-1}$) também apresentaram diferença significativa.

4.2 PRODUÇÃO LABORATORIAL DE CERVEJA ESTILO CATHARINA SOUR: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS.

Os resultados da determinação dos AOA, nas amostras obtidas durante as etapas da produção em escala laboratorial do chope estilo Catharina Sour, podem ser consultados na tabela do Apêndice B.

Analisando os resultados, pode-se observar que apenas os ácidos malônico, cítrico e láctico foram quantificados em todas as amostras e que os ácidos succínico e acético não foram quantificados na etapa de mosturação. Além disso, também foi observado que o ácido maleico não foi detectado em nenhuma das amostras e que o ácido málico foi quantificado na etapa de mosturação, diferentemente da produção na cervejaria artesanal, como demonstrado na Figura 19.

Figura 19 - Ácidos orgânicos alifáticos (AOA) presentes em amostras do processamento laboratorial da cerveja Catharina Sour. (A) AOA de maiores concentrações nas amostras, (B) AOA de concentrações intermediárias e (C) AOA de menores concentrações nas amostras.



Legenda: M1- mosto; M2- fermentação láctica; M3- fermentação alcoólica; M4- maturação pré-fruta; M5- chope de morango e maracujá; M6- chope de tangerina e M7- Chope de caju. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey.

Fonte: Próprio autor (2023).

Ainda, de acordo com a Figura 19 (A), foi possível perceber que o ácido láctico foi o ácido predominante nas amostras, seguido dos ácidos malônico e cítrico. Além disso, é possível observar os ácidos cítrico e málico foram os ácidos que apresentaram a maior diferença significativa após a adição das polpas de frutas e que os ácidos succínico e acético não foram quantificados durante a etapa de mosturação.

Na Figura 19 (C) pode-se observar que o ácido fórmico foi detectado apenas na etapa de mosturação ($105 \pm 1,12 \text{ mg L}^{-1}$), esse resultado é similar ao encontrado nas amostras da produção artesanal, diferindo apenas na concentração. Como mencionado anteriormente, esse ácido pode ter origem do malte de trigo e como a porcentagem de malte de trigo utilizado durante a elaboração desse chope foi maior do que a do chope da cervejaria artesanal, essa maior concentração pode ser justificada devido a esse fator. Contudo, sabe-se que o ácido fórmico não é um ácido majoritário nos grãos de trigo (ZÖRB et al., 2006), desse modo, sua produção pode estar vinculada a etapa de malteação do trigo, visto que, durante a maltagem, os microrganismos presentes nesses grãos podem produzir diferentes ácidos, o que irá contribuir para a diferenciação entre as composições dos maltes (SOUTH, 1996; XIANG, 2006; CHIDI et al., 2018; MENDES & MENDES-FAIA, 2020). Portanto, sua presença, provavelmente, seja devido a sua formação durante o processo de maltagem do trigo. Além disso, esse ácido não foi quantificado nas etapas seguintes, sugerindo o seu provável uso durante a etapa de fermentação láctica. Contudo, não foi encontrado na literatura informações sobre o metabolismo desse ácido durante essa fermentação, sendo necessários mais estudos para avaliar essa informação.

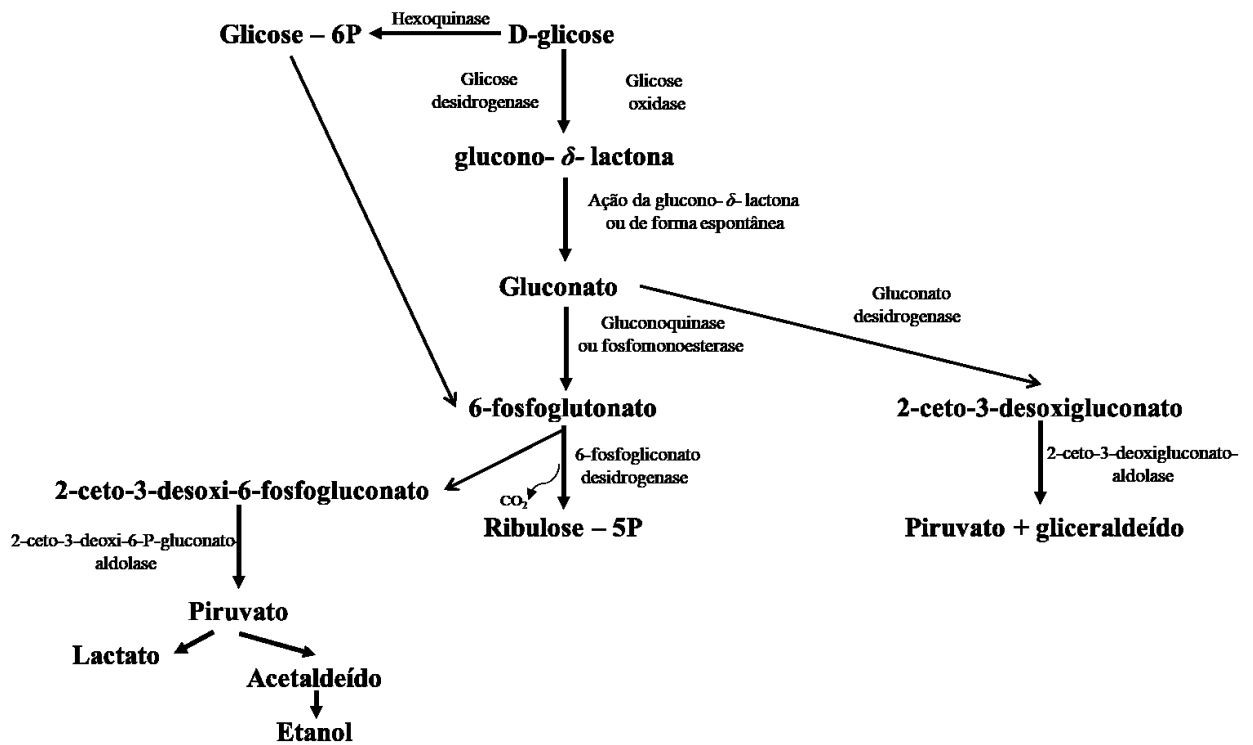
Ainda sobre a Figura 19 (C), foi observado que o ácido tartárico apresentou baixas concentrações durante todas as etapas de produção, iniciando com $35 \pm 1,93 \text{ mg L}^{-1}$ na mosturação, aumentando significativamente para $39,2 \pm 0,71 \text{ mg L}^{-1}$ na fermentação láctica e na fermentação alcoólica não teve alteração significativa na concentração $38,8 \pm 0,67 \text{ mg L}^{-1}$. Durante a maturação, esse ácido reduziu significativamente sua concentração ($33,9 \pm 1,20 \text{ mg L}^{-1}$) e também após a adição das polpas de morango e maracujá ($21,2 \pm 0,58 \text{ mg L}^{-1}$). Esses resultados demonstram que o ácido tartárico é pouco sintetizado durante as etapas de fermentação, o que já era esperado visto que poucos microrganismos são capazes de produzir esse ácido (WHITING, 1976). Além disso, esse ácido apresentou um comportamento diferente nos chopes de tangerina e caju, não sendo identificado nesses produtos. O ácido tartárico está presente no morango ($41 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$) e no maracujá ($4720,95 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$),

contudo, essa concentração vai depender de fatores como o genótipo da planta e do estágio de maturidade dos frutos (STURM et al., 2003; RAMAIYA et al., 2019). Esse ácido também é encontrado no caju (16,84 mg 100 g⁻¹), porém, comparado ao ácido málico (103,8 mg 100 g⁻¹), predominante nessa fruta, essa concentração é baixa. Em relação à tangerina, segundo a literatura consultada, esse ácido não está presente nesses frutos (KARADENIZ, 2004; SCHERER et al., 2008). Desse modo, a não determinação do ácido tartárico nessas amostras, provavelmente, deve-se a sua degradação durante a fase de maturação e, assim, a concentração encontrada no chope de morango e maracujá seja devido à contribuição do fruto. Outra informação relevante é que o ácido tartárico é considerado um hidroácido com boa solubilidade em água, o que pode ter ocasionado a redução da sua concentração devido à diluição realizada para as análises, dificultando a sua identificação no método utilizado. Além disso, esse ácido pode ter sido influenciado pela composição dessas frutas, podendo ter sofrido precipitação ou devido à formação de sais, como o tartarato de cálcio (TARVIN; BUSWELL, 1934; SALGADO, 2010).

Na Figura 19 (B), pode-se observar que o ácido glucônico apresentou o mesmo comportamento das amostras da produção artesanal, estando presente na etapa de mosturação ($62,2 \pm 1,47$ mg L⁻¹), contudo, na produção em escala laboratorial, durante a fermentação láctica, esse ácido aumentou significativamente ($136 \pm 5,94$ mg L⁻¹) e após a adição das polpas de morango e maracujá ($151 \pm 2,32$ mg L⁻¹), esse ácido apresentou a sua maior concentração. O ácido glucônico pode ser sintetizado a partir da glicose, essa reação pode ser catalisada pela glicose desidrogenase (bactérias) ou pela glicose oxidase (fungos), como demonstrado na Figura 20. Nas bactérias lácticas, a glicose é oxidada a ácido glucônico, em seguida, esse ácido é catabolizado durante a vida das pentoses (Fig. 2, pág. 33), contudo, quando essa via é reprimida, ocorre o acúmulo do ácido glucônico (RAMACHANDRAN et al., 2006), o que pode justificar o aumento nessa etapa. Durante a fermentação alcoólica o ácido glucônico não foi quantificado, esse resultado demonstra que esse ácido não foi sintetizado e que foi catabolizado pelas leveduras para a produção de outros compostos, contudo, como mencionado anteriormente, não foram encontrados estudos sobre o processo de degradação desse ácido pela *S. cerevisiae*. Na Figura 20 estão representadas as vias de produção e degradação do ácido glucônico por bactérias e fungos e embora os autores não tenham citado a degradação pela levedura *S. cerevisiae*, supõe-se que o ácido glucônico tenha sido degradado a ácido pirúvico e posteriormente a outros compostos, como AOA, etanol etc.

Após a adição das polpas, esse ácido apresentou comportamento semelhante ao ácido tartárico, sendo quantificado apenas no chope de morango e maracujá, contudo, diferentemente do tartárico, o glucônico não está presente em concentrações relevantes para justificar esse aumento significativo após a sua adição (STURM et al., 2003; KARADENIZ, 2004; SCHERER et al., 2008; RAMAIYA et al., 2019). Desse modo, supõe-se que a produção desse ácido durante essa etapa seja devido à presença de microrganismos capazes de sintetizar esse ácido a partir da glicose (Figura 20). Esses microrganismos podem ter sido oriundos da polpa utilizada no preparo do chope ou por contaminação durante essa etapa.

Figura 20 - Via do Gluconato.



Fonte: Adaptado de Ramachandran et al., 2006.

Ainda, de acordo com a Figura 19 (B), pode-se observar que o ácido málico, diferentemente do chope da cervejaria artesanal, estava presente no malte utilizada na elaboração do mosto, com concentração de $119,3 \pm 8,22 \text{ mg L}^{-1}$, contudo, durante a fermentação láctica esse ácido não foi quantificado. As bactérias lácticas, como o *L. plantarum*, são capazes de realizar a fermentação maloláctica (Figura 18), desse modo, a não quantificação desse ácido, nesse período, pode ser devido à utilização do ácido málico para a

produção de ácido láctico. Além disso, essa BAL pode atuar como heterofermentativa, produzindo ácido acético, como observado nos resultados (SOUTH, 1996; XIANG, 2006; CHIDI et al., 2018; MENDES & MENDES-FAIA, 2020). Durante a fermentação alcoólica ($49,5 \pm 3,62 \text{ mg L}^{-1}$) e a maturação ($50,6 \pm 2,07 \text{ mg L}^{-1}$), o ácido málico não apresentou diferença significativa em sua concentração, entretanto, após a adição das polpas de morango e maracujá, esse ácido apresentou a sua maior concentração ($653 \pm 29,7 \text{ mg L}^{-1}$). Após a adição das polpas de tangerina ($233 \pm 5,66 \text{ mg L}^{-1}$) e caju ($260 \pm 6,26 \text{ mg L}^{-1}$), a concentração também aumentou significativamente. Os frutos de morango (HOLCROFT & KADER, 1999; KOYUNCU & DILMAÇÜNAL, 2010; IKEGAYA et al., 2019), Maracujá (RAMAIYA et al., 2019; DE OLIVEIRA, 2014; ZHANG et al., 2021), caju (MARC ET AL., 2012) e tangerina (CUNHA et al., 2002; KARADENIZ, 2004; ROONGRUANGSRI et al, 2012) apresentam em sua composição o ácido málico, sendo os frutos de maracujá (9,95 - 489 mg/100g) e caju (103,8 mg/100g) os que apresentam as maiores concentrações, porém, a concentração desse ácido pode sofrer alterações durante o amadurecimento e no preparo da polpa, o que irá influenciar sua concentração no chope (LEE et al., 2010).

O ácido cítrico (Figura 19 A) apresentou concentração no mosto de $474,2 \pm 13,6 \text{ mg L}^{-1}$, aumentando significativamente durante a fermentação láctica ($616 \pm 33,4 \text{ mg L}^{-1}$) e se manteve, estatisticamente, constante durante a fermentação alcoólica ($623 \pm 18,5 \text{ mg L}^{-1}$) e maturação ($655 \pm 29,3 \text{ mg L}^{-1}$). Como mencionado anteriormente, o ácido cítrico desempenha um papel importante nos processos bioquímicos, podendo ser degradado e sintetizado ao longo dessas fermentações (HONG; FANG, 2015; CHIDI et al., 2018), desse modo, a não alteração significativa na concentração entre essas etapas, pode ser devido ao fato das coletas terem sido realizadas ao final dos processos, quando essas reações estão reduzidas. Após a adição das polpas de morango e maracujá, esta concentração aumentou significativamente ($1984 \pm 37,40 \text{ mg L}^{-1}$), o mesmo ocorreu para os chopes de tangerina ($1100 \pm 12,22 \text{ mg L}^{-1}$) e caju ($1202 \pm 30,91 \text{ mg L}^{-1}$). Os frutos de morango, maracujá e caju, adicionadas na produção, apresentam o ácido cítrico em sua composição, podendo apresentar concentrações de $1204,4 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, $1487,3 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, $1440 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ e $6,47 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$, respectivamente. Em tangerina, a concentração de ácido cítrico diminui com o amadurecimento, variando de $4551 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ no fruto verde a $900 \text{ mg } 100 \text{ g}^{-1}$ no fruto maduro (HOLCROFT & KADER, 1999; KOYUNCU; DILMAÇÜNAL, 2010; MARC et al., 2012; ROONGRUANGSRI et al, 2012;

IKEGAYA et al., 2019), o que pode justificar o chope de tangerina apresentar menor concentração do que o chope de caju.

O ácido acético (Figura 19 B), diferentemente da produção da cervejaria artesanal, não foi quantificado na etapa de mosturação, demonstrando que não estava presente no malte utilizado (SOUTH, 1996; XIANG, 2006). Na etapa de fermentação láctica, o acético foi quantificado ($228 \pm 7,22 \text{ mg L}^{-1}$), como mencionado anteriormente, o *L. plantarum* pode atuar como uma BAL heterofermentativa produzindo ácido acético durante a fermentação láctica, o que justifica a sua produção durante essa etapa. Entretanto, esse ácido não foi quantificado durante a fermentação alcoólica, esse resultado não era esperado, visto que as leveduras produzem o ácido acético durante a fermentação. Desse modo, supõe-se que a não quantificação seja devido à coleta das amostras terem sido realizadas em um período em que esse ácido estava sendo utilizado durante o metabolismo da levedura (WHITING 1976; ERASMUS et al., 2003; MENDES & MENDES-FAIA, 2020), assim, sua concentração era baixa e após as diluições para as análises, esse ácido ficou abaixo do limite de quantificação do método. Na etapa de maturação o ácido acético foi quantificado ($73,6 \pm 3,51 \text{ mg L}^{-1}$) e após a adição das polpas a concentração aumentou significativamente.

O ácido succínico apresentou o mesmo comportamento do acético, não sendo quantificado na mosturação (Figura 19 C) e sendo quantificado na fermentação láctica ($21,4 \pm 0,84 \text{ mg L}^{-1}$). Durante as etapas de fermentação alcoólica ($109,6 \pm 3,82 \text{ mg L}^{-1}$), maturação ($117 \pm 5,67 \text{ mg L}^{-1}$) e após a adição das polpas de morango e maracujá ($116 \pm 4,84 \text{ mg L}^{-1}$) e caju ($116 \pm 1,74 \text{ mg L}^{-1}$), o ácido succínico não apresentou mudança significativa na sua concentração, entretanto, após a adição da polpa de tangerina ($129 \pm 1,91 \text{ mg L}^{-1}$), esse ácido apresentou a sua maior concentração. Esse resultado demonstra a contribuição da adição da polpa para a concentração do ácido succínico, entretanto, não foi encontrado na literatura estudos que apontavam o ácido succínico como ácido presente na composição desse fruto (CUNHA et al., 2002; KARADENIZ, 2004; ROONGRUANGSRI et al, 2012).

Na figura 19 (A), pode-se observar que o ácido malônico teve um comportamento semelhante às amostras da cervejaria artesanal, sendo quantificado no mosto ($979 \pm 3,88 \text{ mg L}^{-1}$), na fermentação láctica ($986,6 \pm 16,09 \text{ mg L}^{-1}$), reduzindo significativamente durante a alcoólica ($754 \pm 38,6 \text{ mg L}^{-1}$) e voltando a aumentar na maturação ($847,6 \pm 16,03 \text{ mg L}^{-1}$). Diferentemente da produção artesanal, após a adição das polpas de morango e maracujá ($935 \pm 19,2 \text{ mg L}^{-1}$) e tangerina ($1188 \pm 13,96 \text{ mg L}^{-1}$), a concentração aumentou

significativamente e apresentou a sua maior concentração após a adição da polpa de caju ($1296 \pm 37,02 \text{ mg L}^{-1}$).

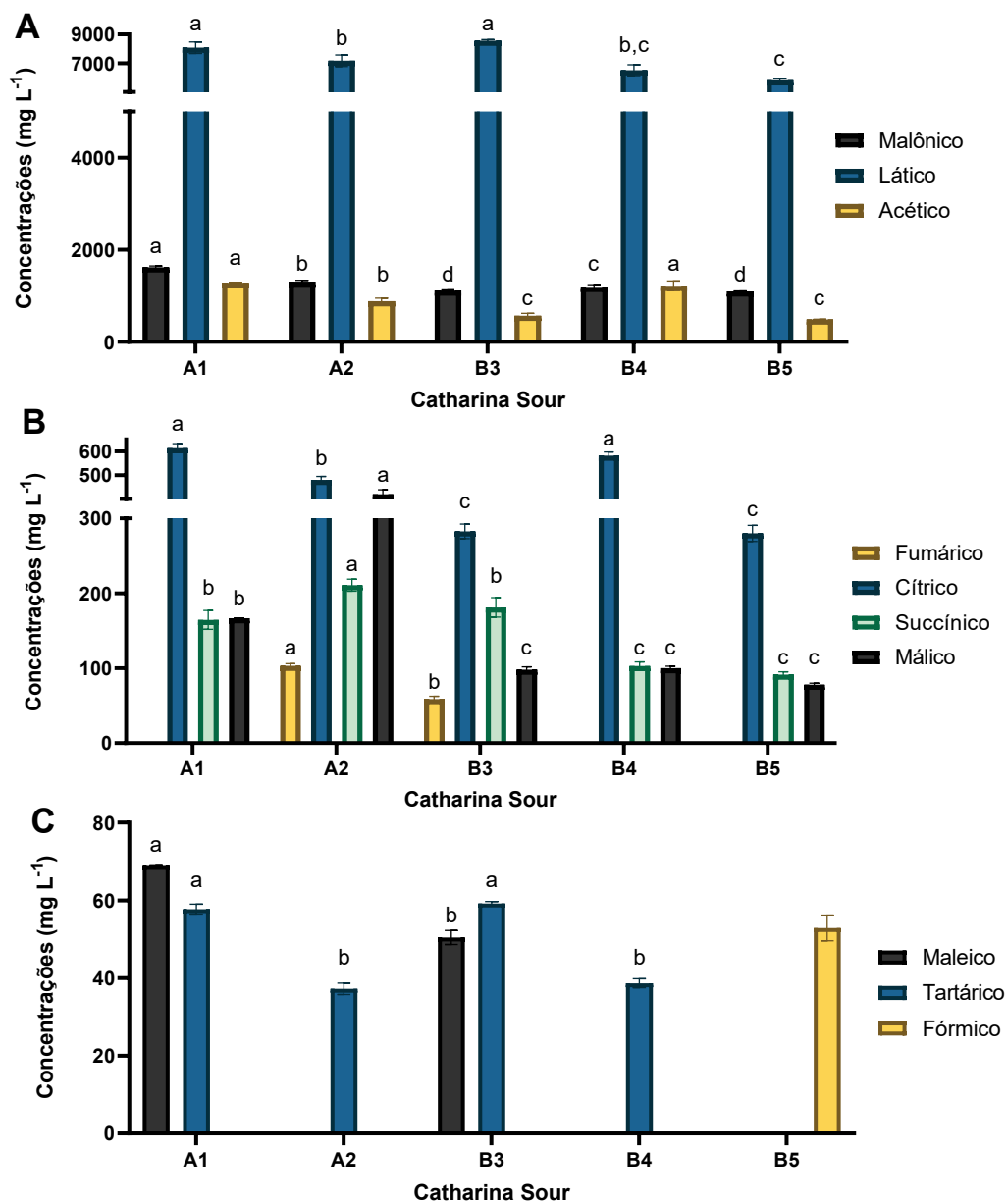
Ainda na Figura 19 (A), pode-se observar que o ácido láctico estava presente no malte utilizado, pois apresentou concentração de $853,1 \pm 30,59 \text{ mg L}^{-1}$ na etapa de mosturação. Essa concentração é superior à encontrada na amostra oriunda da cervejaria artesanal, entretanto, sabe-se que a concentração dos ácidos no malte vai depender de fatores relacionados ao cultivo desses grãos e do processo de maltagem (BAXTER; HUGHES, 2001; BRIGGS et al., 2004; RODRIGUES et al., 2015). Na maltagem o ácido láctico é produzido durante a maceração dos grãos, na etapa de germinação esse ácido pode ser sintetizado ou degradado dependendo da microbiota presente nesses grãos e durante a secagem também ocorre a produção do ácido láctico (SOUTH, 1996; XIANG, 2006; RODRIGUES et al., 2015; HARRISON; ALBANESE, 2017; BETTENHAUSEN et al., 2018). Além disso, essa concentração também pode estar relacionada à adição do ácido láctico no mosto para a redução do pH antes da adição da BAL. Após a fermentação láctica, a concentração aumentou significativamente para $5112 \pm 5,94 \text{ mg L}^{-1}$ e após a fermentação alcoólica, aumentou para $5527 \pm 120,6 \text{ mg L}^{-1}$. Esse aumento significativo na concentração do ácido láctico é considerado um indicador das cervejas *sours*, pois as cervejas que não passam por esses dois processos fermentativos apresentam concentrações inferiores desse ácido, como apresentado na Figura 8 e Tabela 3 da revisão bibliográfica. Na etapa de maturação, o ácido láctico apresentou a sua maior concentração ($5786 \pm 229,4 \text{ mg L}^{-1}$) e após a adição das polpas de morango e maracujá ($4517 \pm 219,3 \text{ mg L}^{-1}$), tangerina ($4961 \pm 105 \text{ mg L}^{-1}$) e caju ($5115 \pm 120,9 \text{ mg L}^{-1}$), a concentração reduziu significativamente.

4.3 CERVEJAS COMERCIAIS DE CATHARINA SOUR: CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS ALIFÁTICOS.

Os resultados da determinação dos AOA, nas amostras comerciais de cervejas estilo Catharina Sour, podem ser consultados na tabela do Apêndice C.

Analisando os resultados, pode-se observar que, diferentemente das amostras da produção, as amostras comerciais A2 ($103 \pm 2,78 \text{ mg L}^{-1}$) e B3 ($58,9 \pm 3,45 \text{ mg L}^{-1}$) apresentaram o ácido fumárico em sua composição. Além disso, o ácido fórmico foi detectado apenas na amostra B5 ($52 \pm 4,04 \text{ mg L}^{-1}$), como demonstrado na Figura 21. A seguir serão apresentados os resultados separadamente para cada amostra.

Figura 21 - Ácidos orgânicos alifáticos (AOA) presentes em amostras comerciais da cerveja estilo Catharina Sour de duas cervejarias distintas (A e B). Gráfico (A) AOA de maiores concentrações nas amostras, (B) AOA de concentrações intermediárias e (C) AOA de menores concentrações nas amostras.



Legenda: A1- cerveja de abacaxi e hortelã; A2- cerveja de uva e gengibre; B3- cerveja de jabuticaba; B4 cerveja de framboesa; B5- cerveja de uva Goethe. Codificação das amostras com letras semelhantes dizem respeito à mesma cervejaria. Diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), pelo teste de Tukey. Fonte: Próprio autor (2023).

A amostra A1 é a Catharina Sour contendo abacaxi e hortelã, essa cerveja apresentou todos os AOA avaliados, exceto os ácidos fumárico e fórmico que não foram detectados (com respectivos LOD $\leq 1,30 \text{ mg L}^{-1}$ e $\leq 0,40 \text{ mg L}^{-1}$). Essa Catharina Sour apresentou as maiores concentrações em quase todos os ácidos, entre as 5 amostras, sendo o ácido láctico o majoritário ($8083 \pm 396,0 \text{ mg L}^{-1}$), seguido dos ácidos malônico ($1621 \pm 25,33 \text{ mg L}^{-1}$), acético ($1286 \pm 8,79 \text{ mg L}^{-1}$), cítrico ($614 \pm 18,4 \text{ mg L}^{-1}$), málico ($167 \pm 0,09 \text{ mg L}^{-1}$), succínico ($164 \pm 12,6 \text{ mg L}^{-1}$), maleico ($68,8 \pm 0,02 \text{ mg L}^{-1}$) e tartárico ($57,7 \pm 1,25 \text{ mg L}^{-1}$). O abacaxi contém os ácidos cítrico e málico como ácidos majoritários e a contribuição desses ácidos é visível nos resultados (Figura 21 B), especialmente do ácido cítrico que apresentou a sua maior concentração nessa amostra, demonstrando a acidez presente no fruto de abacaxi e sua contribuição para o produto final (SARADHULDHAT; PAULL, 2007; DE ANCOS, 2007). Já a hortelã contém os ácidos cítrico, málico, tartárico e succínico (TRUICĂ et al., 2013) em sua composição, no entanto, foi utilizado o extrato de hortelã e não foi informada a quantidade para verificar se essa adição pode ter influenciado, significativa, na concentração final desses ácidos.

Amostra A2 é a Catharina Sour de uva (bordô) e gengibre, essa cerveja apresentou todos os AOA avaliados, exceto os ácidos fórmico (LOD $\leq 0,40 \text{ mg L}^{-1}$) e maleico (LOD $\leq 1,12 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como na amostra A1, o ácido láctico foi o majoritário ($7178 \pm 403 \text{ mg L}^{-1}$), seguido dos ácidos malônico ($1306,1 \pm 31,45 \text{ mg L}^{-1}$), acético ($884 \pm 68,1 \text{ mg L}^{-1}$), cítrico ($480 \pm 14,4 \text{ mg L}^{-1}$), málico ($420 \pm 18,7 \text{ mg L}^{-1}$), succínico ($211 \pm 8,07 \text{ mg L}^{-1}$), fumárico ($103,2 \pm 2,78 \text{ mg L}^{-1}$) e tartárico ($37,3 \pm 1,48 \text{ mg L}^{-1}$). A cervejaria também não disponibilizou informações detalhadas da composição dessa bebida, apenas o que é exigido pela Instrução Normativa nº 65, de 10 de dezembro de 2019 (MAPA), contudo, como as amostras A1 e A2 são oriundas da mesma cervejaria, supõe-se que a BAL e a porcentagem de malte utilizado na produção dessa cerveja tenham sido os mesmos da amostra A1, pois as indústrias costumam manter um padrão nos ingredientes utilizados durante a produção. Os ácidos málico, cítrico e tartárico são os ácidos primários presentes nas uvas (BISSON, 2004; CHIDI et al., 2018; MENDES & MENDES-FAIA, 2020; CIOCH-SKONECZNY et al, 2022), contudo, essa amostra apresentou baixos teores do ácido tartárico, demonstrando que essa adição, provavelmente, não influenciou significativamente na concentração final desse ácido na bebida. Entretanto, deve-se lembrar de que a concentração desse ácido na uva sofre alterações dependendo de fatores como a utilização da casca no preparo da polpa, a

composição do solo em que foi cultivado, o clima, entre outros fatores que irão interferir na síntese desse ácido (CHIDI et al., 2018). Também vale ressaltar que não se sabe qual a concentração inicial desse ácido no mosto para poder afirmar se essa adição foi ou não significativa para a concentração final. O gengibre contém os ácidos oxálico e tartárico (YEH et al., 2014) em sua composição, contudo, o ácido oxálico não foi detectado na amostra. Esse caso é semelhante ao da hortelã, em que a baixa concentração, provavelmente, não irá influenciar na concentração desses ácidos no produto final, sendo a sua adição mais importante para as características sensoriais do produto. Diferentemente da amostra A1, o ácido maleico ($\text{LOD} \leq 1,12 \text{ mg L}^{-1}$) não foi detectado, esse resultado não era esperado, visto que as duas amostras (Figura 21 C) são oriundas da mesma cervejaria e assim o processamento até a maturação pré-fruta deveria ser semelhante. Nesse caso, provavelmente, essa diferenciação seja devido a diferentes características presente no malte utilizado para a produção das duas cervejas (XIANG, 2006). Além disso, o ácido fumárico (Figura 21 B) foi quantificado apenas na amostra A2, contudo, não foi encontrado na literatura justificativa para esse resultado, visto que esse ácido não é prioritário na uva e nem no gengibre, além de não ser um ácido com grande produção durante os processos fermentativos. Assim, sua origem também deve ser vinculada as características individuais do malte utilizado.

A amostra B3 é a Catharina Sour de jabuticaba, essa cerveja apresentou todos os AOA avaliados, exceto o ácido fórmico que não foi detectado ($\text{LOD} \leq 0,40 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como nas amostras anteriores, o ácido láctico foi o majoritário ($8573 \pm 75,4 \text{ mg L}^{-1}$), seguido dos ácidos malônico ($1115 \pm 12,25 \text{ mg L}^{-1}$), acético ($568 \pm 51,3 \text{ mg L}^{-1}$), cítrico ($283 \pm 9,79 \text{ mg L}^{-1}$), succínico ($181 \pm 13 \text{ mg L}^{-1}$), málico ($98,1 \pm 3,67 \text{ mg L}^{-1}$), tartárico ($59,2 \pm 0,51 \text{ mg L}^{-1}$), fumárico ($58,9 \pm 3,45 \text{ mg L}^{-1}$) e maleico ($50,4 \pm 1,78 \text{ mg L}^{-1}$). O fruto de jabuticaba apresenta o ácido cítrico como o ácido predominante, seguido do ácido succínico, málico e acético, contudo, essa ordem pode ser alterada dependendo da variedade analisada. Dois exemplos são as variedades Sabará e Açu Paulista que apresentam o ácido succínico como ácido prioritário, seguido do ácido cítrico (JHAM, 2007; LIMA et al., 2011; ALBUQUERQUE et al., 2020). A concentração do ácido láctico foi a maior entre as 5 amostras analisadas. Essa maior concentração pode ser justificada por fatores relacionados à etapa de fermentação láctica, por exemplo, a utilização de BAL homofermentativas, maior concentração de açúcares fermentescíveis no mosto durante a fermentação, boas fontes de nitrogênio, entre outros fatores (HUTKINS, 2006; KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J., 2017;

MENDES & MENDES-FAIA, 2020; OBERG et al., 2022). Além disso, também pode ter ocorrido a fermentação maloláctica que irá contribuir para a produção de ácido láctico (HARRISON; ALBANESE, 2017; CHIDI et al., 2018). O ácido acético apresentou menor concentração que na amostra A1, amostra que também apresentou altas concentrações de ácido láctico, esse resultado supõe que a amostra A1 utilizou uma BAL heterofermentativa, visto que apresentou alta concentração de ácido láctico e acético, enquanto que na B3 a BAL utilizada pode ter sido homofermentativas, apresentando alta concentração de ácido láctico e baixa de acético (SCHOCH et al., 2020; OBERG et al., 2022).

A amostra B4 é a Catharina Sour de framboesa, essa cerveja apresentou todos os AOA avaliados, exceto os ácidos fórmico ($\text{LOD} \leq 0,40 \text{ mg L}^{-1}$), fumárico ($\text{LOD} \leq 1,30 \text{ mg L}^{-1}$) e maleico ($\text{LOD} \leq 1,12 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como nas amostras anteriores, o ácido láctico foi o ácido majoritário ($6352 \pm 228,8 \text{ mg L}^{-1}$), seguido dos ácidos malônico ($1217 \pm 24,44 \text{ mg L}^{-1}$), acético ($1209 \pm 99,03 \text{ mg L}^{-1}$), cítrico ($583 \pm 14,8 \text{ mg L}^{-1}$), succínico ($103 \pm 5,46 \text{ mg L}^{-1}$), málico ($100 \pm 2,56 \text{ mg L}^{-1}$) e tartárico ($38,7 \pm 1,15 \text{ mg L}^{-1}$). Assim como na amostra A1, o ácido acético (Figura 21 A) apresentou alta concentração, contudo, diferentemente dessa amostra, a amostra B4 apresentou menor concentração de ácido láctico. Esse resultado supõe a utilização de BAL heterofermentativa e a menor concentração de ácido láctico pode estar relacionada às condições de fermentação, visto que são de duas cervejarias diferentes (A e B). Além disso, essa maior concentração de ácido láctico da amostra A1 pode ser devido a utilização do ácido láctico para ajuste do pH durante a produção. A framboesa contém em sua composição o ácido cítrico como majoritário, seguido do ácido málico, essa acidez é observada nos resultados apresentados na Figura 21 (B), que demonstra a possível contribuição dessa fruta para a concentração desse ácido na cerveja (PONDER; HALLMANN, 2020).

A amostra B5 é a Catharina Sour de uva Goethe, essa cerveja apresentou todos os AOA avaliados, exceto o ácido fumárico ($\text{LOD} \leq 1,30 \text{ mg L}^{-1}$) e maleico ($\text{LOD} \leq 1,12 \text{ mg L}^{-1}$), além disso, o ácido tartárico não foi quantificado nessa amostra ($\text{LOQ} \leq 2,57$). Assim como nas amostras anteriores, o ácido láctico foi o ácido majoritário, contudo, apresentou a menor concentração entre as cinco amostras ($5826 \pm 129,5 \text{ mg L}^{-1}$). Os ácidos malônico ($1098 \pm 9,07 \text{ mg L}^{-1}$), acético ($487 \pm 4,36 \text{ mg L}^{-1}$), cítrico ($277 \pm 13,2 \text{ mg L}^{-1}$), succínico ($90,5 \pm 4,36 \text{ mg L}^{-1}$), málico ($77,6 \pm 2,33 \text{ mg L}^{-1}$) e fórmico ($52 \pm 4,04 \text{ mg L}^{-1}$) também foram quantificados. Essa Catharina Sour apresentou as menores concentrações em todos os ácidos,

exceto o ácido fórmico. Além disso, o ácido tartárico apresentou concentrações abaixo do limite de quantificação ($LOQ \leq 2,57$), o que não era esperado, visto que esse ácido não é metabolizado pela maioria dos microrganismos, desse modo sua concentração não deveria apresentar grandes variações durante as etapas de fermentação, como observado nas análises das amostras de produção da cervejaria artesanal e laboratorial, em que o tartárico foi quantificado em todas as etapas de produção. Além disso, na amostra A2 (uva bordô e gengibre) o tartárico foi quantificado. O ácido tartárico, apesar de ocorrer variações nas concentrações das diferentes variedades de uva, não é metabolizado durante a respiração do fruto e assim não ocorre uma alta degradação durante a maturação, deste modo, a adição da polpa deveria ter contribuído para essa concentração, porém, não se sabe a quantidade de polpa adicionada no tanque de maturação e se ocorreu maior diluição desse ácido nessa amostra do que na A2, impossibilitando a sua quantificação (BISSON, 2004; CHIDI et al., 2018; MENDES & MENDES-FAIA, 2020; CIOCH-SKONECZNY et al, 2022).

5 CONCLUSÕES

Através da realização desse trabalho foi possível concluir que a concentração dos ácidos orgânicos alifáticos nas cervejas estilo Catharina Sour vai depender da matéria-prima utilizada na elaboração do mosto, das etapas de fermentação e da adição das frutas e especiarias.

Além disso, os resultados da análise das etapas de produção dos chopes demonstraram certa similaridade entre os ácidos encontrados (malônico, tartárico, cítrico, málico, láctico, glucônico, succínico e acético), apresentando diferenças apenas em suas concentrações.

Os resultados obtidos para as cervejas comerciais, assim como as dos chopes, apresentaram perfil de ácidos orgânicos semelhantes, sendo os ácidos láctico, malônico, cítrico, málico, succínico e acético, encontrados em todas as cervejas.

Os resultados apresentados demonstram a importância da análise da composição da cerveja estilo Catharina Sour, pois as amostras demonstraram maior teor de ácidos orgânicos alifáticos, quando comparados com os dados encontrados na literatura para outros estilos. Contudo, a determinação desses ácidos não foi suficiente para caracterizar o estilo por meio de um ou mais marcadores ácidos, uma vez que houve uma variabilidade significativa dos perfis e concentrações nos produtos finais.

Além disso, esse estudo contribuiu com a geração de dados sobre a composição do estilo Catharina Sour, entretanto, mais estudos devem ser realizados para a caracterização desse estilo que apresenta características não só das cervejas de trigo e das *sours*, mas também das *fruit beer*, a tornando única.

Nessa perspectiva, faz-se necessário a ampliação do estudo durante a produção desse estilo de cerveja, através de parcerias com as cervejarias do Estado de Santa Catarina, analisando essa produção desde o malte utilizado até a cerveja final.

Deste modo, a ampliação desse estudo irá contribuir para a busca de uma faixa de ácido láctico que seja característico desse estilo, o diferenciando das outras *sours*, além disso, pode-se analisar a real contribuição da adição das frutas e/ou especiarias para esse estilo, acompanhando as alterações que ocorrem após a adição desses ingredientes no mosto de maturação até o produto final.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, B. R., et al. Jaboticaba residues (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) are rich sources of valuable compounds with bioactive properties. **Food chemistry**, vol. 309, p. 125735, 2020.
- ALVES, B. **Catharina Sour: Novo Estilo de Cerveja Leva Frutas em Sua Composição**. 2019. Disponível em: <https://revistacasaedjardim.globo.com/Casa-eComida/noticia/2019/03/catharina-sour-novo-estilo-de-cerveja-leva-frutas-em-suacomposicao.html>. Acesso em: 20 de maior de 2022.
- ANDERSON, H. E. et al. A review of the analytical methods used for beer ingredient and finished product analysis and quality control. **Analytica Chimica Acta**, v. 1085, p. 1-20, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.07.061>
- AQUARONE, E. et al. **Biotechnologia industrial: biotecnologia na produção de alimentos**. Edgard Blucher, 2001.
- AXELSSON, L. et al. Lactic acid bacteria: classification and physiology. **Food Science and Technology**, v. 139, p. 1-66, 2004.
- BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnol Adv**, v. 26, n. 1, p. 89-105, 2008.
- BAMFORTH, C. W. **Beer: tap into the art and science of brewing**. Oxford University Press, 2009.
- BAXTER, E. D; HUGHES, P. S. **Beer: Quality, safety and nutritional aspects**. Royal Society of Chemistry, 2001.
- BETTENHAUSEN, H. M. et al. Influence of malt source on beer chemistry, flavor, and flavor stability. **Food Research International**, v. 113, p. 487-504, 2018.
- BISSON, L.F. The biotechnology of wine yeast. **Food Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 63-96, 2004.
- BJCP. Beer Style Guidelines, 2021. Disponível em: < www.bjcp.org >. Acesso em: 15 de março de 2022.
- BLEOANCA, I. et al. Relationship between ethanol and oxidative stress in laboratory and brewing yeast strains. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 116, n. 6, p. 697-705, 2013.
- BOGDAN, P; KORDIALIK-BOGACKA, E. Alternatives to malt in brewing. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 1-9, 2017.

BORTOLI, D. A. et al. Leveduras e produção de cervejas-Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 3, n. 1, p. 45-58, 2013.

BOULTON, R.B. et al. K. Principles and practices of winemaking. **Springer Science & Business Media**, 2013.

BOWMAN, C. E.; WOLFGANG, M. J. Role of the malonyl-CoA synthetase ACSF3 in mitochondrial metabolism. **Advances in biological regulation**, vol. 71, p. 34-40, 2019.

BRANDÃO, R. Cerveja contribuiu com 2,1% do PIB brasileiro em 2021. Valor Investe, São Paulo, 2022. Disponível em: < <https://valorinveste.globo.com/mercados/brasil-e-politica/noticia/2022/03/05/cerveja-contribuiu-com-21-pontos-percentuais-do-pib-brasileiro-em-2021.ghtml>>. Acesso em: 19 de maio de 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC N° 64, de 29 de novembro de 2011. **Dispõe sobre a aprovação de uso de coadjuvantes de tecnologia para fabricação de cerveja**, 2011a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC N° 65, de 29 de novembro de 2011. **Dispõe sobre a aprovação de uso de aditivos alimentares para fabricação de cervejas**. 2011b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria N° 2.914, DE 12 de dezembro de 2011. **Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade**, 2011c.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 65, de 10 de dezembro de 2019. **Estabelece os padrões de identidade e qualidade para os produtos de cervejaria**, 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Anuário da cerveja no Brasil**, 2021.

BRIGGS, D. E. et al. **Brewing: Science and Practice**. Cambridge: CRC Press, 2004.

BRUGNEROTTO, P. et al. A capillary electrophoresis method to determine aliphatic organic acids in bracatinga honeydew honey and floral honey. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 82, p. 103243, 2019.

CATHARINASOUR. História. Disponível em: < <http://catharinasour.com.br/a-historia/>>. Acesso em: 15 de março de 2022.

CARDOSO, P. C. et al. Development and application of a liquid chromatography-mass spectrometry method for the determination of sugars and organic acids in araza, ceriguela, guava, mango and pitanga. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 24, 2021.

CERVBRASIL. Dados do setor. 2020. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/> Acesso em: 15 de março de 2022.

CHAHARDOLI, A. et al. Analysis of organic acids. In: Recent Advances in Natural Products Analysis. **Elsevier**, 2020. p. 767-823.

CHEN, H. et al. Malonyl-CoA synthetase, encoded by ACYL ACTIVATING ENZYME13, is essential for growth and development of Arabidopsis. **The Plant Cell**, vol. 23, no 6, p. 2247-2262, 2011.

CHAN J. H.T.; CHANG, T. S.K; CHENCHIN, E. Nonvolatile acids of passion fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 110-112, 1972.

CHIDI, B. S; BAUER, F. F.; ROSSOUW, D. Organic acid metabolism and the impact of fermentation practices on wine acidity: A review. **South African Journal of Enology and Viticulture**, vol. 39, no 2, p. 1-15, 2018.

CIOCH-SKONECZNY, M. et al. Characteristics of beer brewed with unconventional yeasts and addition of grape must, pulp and marc. **European Food Research and Technology**, p. 1-13, 2022.

COCOLIN, L. et al. Saccharomyces cerevisiae biodiversity during the brewing process of an artisanal beer: A preliminary study. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, n. 3, p. 352-358, 2011.

COLOMBARA, R.; TAVARES, M.; MASSARO, S. Determinação simultânea de ânions por eletroforese capilar: características e aplicações. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 512-518, 1997.

COOTE, N.; KIRSOP, B. H. The content of some organic acids in beer and other fermented media. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 80, n. 5, p. 474-483, 1974.

CORTACERO-RAMÍREZ, S. et al. Determination of low-molecular-mass organic acids in any type of beer samples by coelectroosmotic capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1064, n. 1, p. 115-119, 2005.

CUNHA, S. C.; FERNANDES, J. O.; FERREIRA, I. M. HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. **European Food Research and Technology**, v. 214, p. 67-71, 2002.

DAS, S. et al. Exploring the microbiota and metabolites of traditional rice beer varieties of Assam and their functionalities. **3 Biotech**, v. 9, n. 5, p. 1-10, 2019.

DAS, A. J. et al. HPLC and GC-MS analyses of organic acids, carbohydrates, amino acids and volatile aromatic compounds in some varieties of rice beer from northeast India. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 120, n. 3, p. 244–252, 1 jun. 2014.

DE ANCOS, B.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.. Pineapple composition and nutrition. **Handbook of pineapple technology: Production, postharvest science, processing and nutrition**, p. 221-239, 2017.

DE KLERK, J.L. Succinic Acid Production by Wine Yeasts. Master's Thesis, University of Stellenbosch, Stellenbosch, South Africa, 2010.

DE OLIVEIRA, G. A. et al. Comparison of NIR and MIR spectroscopic methods for determination of individual sugars, organic acids and carotenoids in passion fruit. **Food research international**, v. 60, p. 154-162, 2014.

DEVRIES, K. J. Determination of organic acids in beer by capillary electrophoresis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 51, n. 4, p. 155-157, 1993.

DILAY, E. et al. Modeling, simulation and optimization of a beer pasteurization tunnel. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 3, p. 500-513, 2006.

DYSVIK, A. et al. Co-fermentation involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* species tolerant to brewing-related stress factors for controlled and rapid production of sour beer. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 279, 2020.

DURELLO, R.; SILVA, L.; BOGUSZ, S. Química do lúpulo. **Química Nova**, v. 42, p. 900-919, 2019.

ERASMUS, D. J.; VAN DER MERWE, G.K.; VAN VUUREN, H.J. Genome-wide expression analyses: metabolic adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to high sugar stress. **FEMS yeast research**, v. 3, n. 4, p. 375-399, 2003.

ERNY, G. L. et al. Analysis of non-aromatic organic acids in beer by CE and direct detection mode with diode array detection. **Chromatographia**, v. 70, n. 11, p. 1737-1742, 2009.

FARAG, M. A. et al. Revealing the constituents of Egypt's oldest beer using infrared and mass spectrometry. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

FERREIRA, R. H. et al. Inovação na fabricação de cervejas especiais na região de Belo Horizonte. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 16, p. 171-191, 2011.

FLEET, G. H. **Wine microbiology and biotechnology**. CRC press, 1993.

GHESTI, G. et al. A newer source of microorganism to produce Catharina Sour beers. **Food Science and Technology**, v. 43, 2023.

HAHN-HÄGERDAL, B.; JEPPSSON, H.; SKOOG, K.; PRIOR, B. A. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, p. 993-943, 1994.

HARRISON, M. A.; ALBANESE, J. B. Beer/Brewing. In: **Reference Module in Life Sciences**. [s.l.] Elsevier, 2017.

HEERDE, E.; RADLER, F. Metabolism of the anaerobic formation of succinic acid by *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 269-276, 1978.

HOLCROFT, D. M.; KADER, A. A. Controlled atmosphere-induced changes in pH and organic acid metabolism may affect color of stored strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 17, n. 1, p. 19-32, 1999.

HONG, L; FANG, L. Changes in organic acids during beer fermentation. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 73, n. 3, p. 275-279, 2015.

HUTKINS, R.W. **Microbiology and technology of fermented foods**. John Wiley & Sons, 2008.

IKEGAYA, A. et al. Effects of distribution of sugars and organic acids on the taste of strawberries. **Food Science & Nutrition**, v. 7, n. 7, p. 2419-2426, 2019.

IIMURE, T.; SATO, K. Beer proteomics analysis for beer quality control and malting barley breeding. **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 1013-1020, 2013.

JHAM, G. N. et al. Comparison of GC and HPLC for quantification of organic acids in two jaboticaba (*Myrciaria*) fruit varieties. **Química Nova**, v. 30, p. 1529-1534, 2007.

KARADENIZ, F. Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 28, n. 4, p. 267-271, 2004.

KLAMPFL, C. W. Analysis of organic acids and inorganic anions in different types of beer using capillary zone electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 987-990, 1999.

KÖNIG, H.; FRÖHLICH, J. **Lactic acid bacteria**. En *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, Cham, p. 3-41, 2017.

KOYUNCU, M. A; DILMAÇÜNAL, T. Determination of vitamin C and organic acid changes in strawberry by HPLC during cold storage. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 38, n. 3, p. 95-98, 2010.

KOZAKI, D. et al. Single injection ion-exclusion/cation-exchange chromatography for simultaneous determination of organic/inorganic anions, inorganic cations, and ethanol in beer samples. **Food Chemistry**, v. 274, p. 679-685, 2019.

LAPOLLI, C. **O mercado de cervejas artesanais: no Brasil e em Santa Catarina**. 2019. Disponível em: <<https://simmebnegocios.com.br/images/simmebnegocios.com.br/noticias/OMercadoDeCervejasArtesanais.pdf>>. Acesso em: 20 de maio de 2022.

LEE, S. et al. Metabolic analysis of guava (*Psidium guajava* L.) fruits at different ripening stages using different data-processing approaches. **Journal of Chromatography B**, vol. 878, no 29, p. 2983-2988, 2010.

LIMA, A. B. et al. Sugars, organic acids, minerals and lipids in jaboticaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. 33, p. 540-550, 2011.

LI, Y. et al. Organic acids of commercial beers in China: A chemometric study. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 65, n. 2, p. 86-91, 2007.

LIU, Q. et al. Main organic acids in rice wine and beer determined by capillary electrophoresis with indirect UV detection using 2, 4-dihydroxybenzoic acid as chromophore. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 1, p. 111-117, 2017.

LIU, S.-Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International journal of food microbiology**, v. 83, n. 2, p. 115-131, 2003.

MACKENZIE, K. G.; KENNY, M. C. Non-volatile organic acid and pH changes during the fermentation of distiller's wort. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 71, n. 2, p. 160-165, 1965.

MAFRA, E. Brasil mostra que é um país cada vez mais cervejeiro. Forbes Agro, São Paulo, 2022. Disponível em: < <https://forbes.com.br/forbesagro/2022/09/brasil-mostra-que-e-um-pais-cada-vez-mais-cervejeiro/>>. Acesso em: 19 de outubro de 2022.

MALLETT, J. **Malt: a practical guide from field to brewhouse**. Brewers Publications, 2014.

MARC, A. D. et al. Physico-chemical characterization of cashew apple juice (*Anacardium occidentale*, L.) from Yamoussoukro (cote d'Ivoire). **Innovative Romanian Food Biotechnology**, n. 11, p. 32-43, 2012.

MATO, I. et al. Simultaneous determination of organic acids in beverages by capillary zone electrophoresis. **Analytica Chimica Acta**, v. 565, n. 2, p. 190-197, 2006.

MD NOR, S. et al. ¹H NMR reveals dynamic changes of primary metabolites in purple passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) juice during maturation and ripening. **Agriculture**, v. 12, n. 2, p. 156, 2022.

MEDINA, M. L.; PAGANO, F. Characterization of guava pulp (*Psidium guajava* L.)" Criolla Roja". **Revista de la Facultad de Agronomía**, v. 20, n. 1, p. 72-86, 2003.

MENDES F. A; MENDES-FAIA, A. The role of yeasts and lactic acid bacteria on the metabolism of organic acids during winemaking. **Foods**, v. 9, n. 9, p. 1231, 2020.

MERTENS, S. et al. A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 23, p. 8202-8214, 2015.

MIKULIC-PETKOVSEK, M. et al. Composition of sugars, organic acids, and total phenolics in 25 wild or cultivated berry species. **Journal of food science**, vol. 77, no 10, p. C1064-C1070, 2012.

MONTANARI, L. et al. Organic and phenolic acids in beer. **LWT-Food Science and Technology**, v. 32, n. 8, p. 535-539, 1999.

MORADO, R. **Larousse de cerveja**. Larousse do Brasil, 2017.

MUÑOZ-ARRIETA, R. et al. Nutritional and Chemical Composition of the Costa Rican Guava (*Psidium friedrichsthalianum* [O. Berg] Nied): An Underexploited Edible Fruit with Nutritional and Industrial Potential. **ACS Food Science & Technology**, v. 1, n. 10, p. 1970-1978, 2021.

NEVE, R. A. **Hops**. Springer Science & Business Media, 1991.

OBERG, T. S. et al. Invited review: Review of taxonomic changes in dairy-related lactobacilli. **Journal of Dairy Science**, 2022.

OETTERER, M.; ALCARDE, A. R. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Editora Manole Ltda, 2006.

PAI, T. V. et al. Characterization of Indian beers: chemical composition and antioxidant potential. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 3, p. 1414-1423, 2015.

PALMER, J. J. **How to Brew: Everything you need to know to brew beer right the first time**. Brewers Publications, 2006.

PAPETTI, A.; COLOMBO, R. High-performance capillary electrophoresis for food quality evaluation. In: **Evaluation Technologies for Food Quality**. Woodhead Publishing, 2019. p. 301-377.

PÉREZ-RUIZ, T. et al. High-performance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. **Journal of Chromatography A**, 2004, vol. 1026, no 1-2, p. 57-64.

PARK, S-E. et al. Metabolite profiling of fermented ginseng extracts by gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Ginseng Research**, v. 42, n. 1, p. 57-67, 2018.

PONDER, A.; HALLMANN, E. The nutritional value and vitamin C content of different raspberry cultivars from organic and conventional production. **Journal of Food Composition and Analysis**, vol. 87, p. 103429, 2020.

RAMACHANDRAN, Sumitra et al. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 2, 2006.

RAMAIYA, S. D. et al. Nutritional, mineral and organic acid composition of passion fruit (*Passiflora* species). **Food Research**, v. 3, n. 3, p. 231-240, 2019.

RICE, T. et al. Application of mannitol producing *Leuconostoc citreum* TR116 to reduce sugar content of barley, oat and wheat malt-based worts. **Food microbiology**, v. 90, p. 103464, 2020.

RODRIGUES, J. E. et al. Quantification of organic acids in beer by nuclear magnetic resonance (NMR)-based methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 674, n. 2, p. 166-175, 2010.

RODRIGUES, M. A.; MORAIS, J. S.; CASTRO, J. P. Jornadas de lúpulo e cerveja: novas oportunidades de negócio: **livro de atas**. 2015.

ROONGRUANGSRI, W. et al. Changes in organic acid contents and related metabolic enzyme activities at different stages of growth of two tangerine cultivars. **Journal of Agricultural Science**, v. 4, n. 12, p. 276, 2012.

ROSA, N. A.; AFONSO, J. C. A química da cerveja. **Revista Química Nova. São Paulo**, v. 37, p. 98-105, 2015.

ROZADA-SÁNCHEZ, R. et al. Evaluation of *Bifidobacterium* spp. for the production of a potentially probiotic malt-based beverage. **Process Biochemistry**, vol. 43, no 8, p. 848-854, 2008.

SANCHEZ, R.; SOLODOVNIKOVA, N.; WENDLAND, J. Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. **Yeast**, v. 29, n. 8, p. 343-355, 2012.

SANTALAD, A. et al. Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. **LWT-Food Science and Technology**, v. 40, n. 10, p. 1741-1746, 2007.

SANTA CATARINA. **Lei nº 16.880, de 18 de janeiro de 2016**. Dispõe sobre a criação da Rota das Cervejas de Santa Catarina. Disponível em: <http://leis.alesec.sc.gov.br/html/2016/16880_2016_Lei.html> Acesso em: 09 de março de 2022.

SANTA CATARINA. **Lei nº 13.418 de 09 de março de 2017**. Confere ao Município de Blumenau, no Estado de Santa Catarina, o título de Capital Nacional da Cerveja. Disponível em: < <https://legis.senado.leg.br/norma/17653190/publicacao/17653199>> Acesso em: 15 de março de 2022.

SANTA CATARINA. **Lei nº 18.050, de 29 de dezembro de 2020**. Dispõe sobre percentual mínimo de comercialização de cerveja artesanal produzida no Estado de Santa Catarina, nos eventos realizados com recursos públicos em que houver comercialização de cerveja. Disponível em: < http://leis.alesec.sc.gov.br/html/2020/18050_2020_lei.html> Acesso em: 15 de março de 2022.

SANTA CATARINA. **Lei nº 17.467, de 10 de janeiro de 2018**. Denomina Vale das Cervejas a região formada pelos Municípios que compõem a Associação dos Municípios do Médio Vale do Itajaí (AMMVI), em Santa Catarina e adota outras providências. Disponível em: < http://leis.alesec.sc.gov.br/html/2018/17467_2018_Lei.html> Acesso em: 15 de março de 2022.

SARADHULDHAT, P.; PAULL, R. E. Pineapple organic acid metabolism and accumulation during fruit development. **Scientia Horticulturae**, v. 112, n. 3, p. 297-303, 2007.

SCHERER, R. et al. Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. **Food Chemistry**, v. 135, n. 1, p. 150-154, 2012.

SCHERER, R.; RYBKA, A. C.; GODOY, H. T. Simultaneous determination of tartaric, malic, ascorbic and citric acids in acerola, açai and cashew pulps, and stability evaluation in cashew juices. **Química Nova**, v. 31, p. 1137-1140, 2008.

SCHOCH, C.L. et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database (Oxford), 2020. Disponível em < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1578&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em: 30 de março de 2023.

SDIRI, S. et al. Phenolic composition, organic acids, sugars, vitamin C and antioxidant activity in the juice of two new triploid late-season mandarins. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 462-468, 2012.

SEBRAE. O mercado cervejeiro. 2016. Disponível em: <[http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/arquivos_chronus/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/\\$File/7503.pdf](http://www.bibliotecas.sebrae.com.br/chronus/arquivos_chronus/bds/bds.nsf/8818d2954be64fcda8628defef1f70f8/$File/7503.pdf)> Acesso em: 10 de março de 2022.

SEBRAE. 2º Censo Cervejarias Independentes Brasileiras, 2021. Disponível em: <<https://datasebrae.com.br/wp-content/uploads/2021/12/2%C2%BA-Censo-de-Cervejarias-Independentes-Brasileiras-Vers%C3%A3o-Reduzida-v3.pdf>> Acesso em: 10 de março de 2022.

SIQUEIRA, P. B.; BOLINI, H. M.; MACEDO, G. A. O processo de fabricação da cerveja e seus efeitos na presença de polifenóis. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 491-498, 2009.

SNAUWAERT, I. et al. Microbial diversity and metabolite composition of Belgian red-brown acidic ales. **International Journal of Food Microbiology**, v. 221, p. 1-11, 2016.

SOGA, T.; WAKAURA, M. Determination of inorganic and organic anions in beer and wort by capillary electrophoresis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 55, n. 2, p. 44-46, 1997.

SOUTH, J. B. Changes in organic acid levels during malting. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 102, n. 3, p. 161-166, 1996.

STEWART, G. G. **Beer: Raw Materials and Wort Production**. 1. ed. Elsevier Ltd., 2016.

STRONG, G. Catharina Sour se torna oficialmente 1º estilo brasileiro de cerveja. Revista beer art, 2022. Disponível em <<https://revistabeerart.com/news/catharina-sour-no-guia>>. Acesso em 20 de maio de 2022.

STURM, K.; KORON, D.; STAMPAR, F. The composition of fruit of different strawberry varieties depending on maturity stage. **Food chemistry**, v. 83, n. 3, p. 417-422, 2003.

TAVARES, M. F. Eletroforese capilar: Conceitos básicos. **Química Nova**, 1995.

TAVARES, M. F. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TORAÑO, J.; RAMAUTAR, R; DE JONG, G. Advances in capillary electrophoresis for the life sciences. **Journal of Chromatography B**, v. 1118, p. 116-136, 2019.

TRUICĂ, G. I.; TEODOR, E. D.; RADU, G. L.. Organic acids assessments in medicinal plants by capillary electrophoresis. **Rev. Roum. Chim**, v. 58, n. 9-10, p. 809-814, 2013.

TYRELL, T. et al. Screening of brewery yeast strains regarding organic acid profile in order to find low succinic acid producer. **Brew. Sci**, v. 66, p. 75-84, 2013.

UGALDE, F. et al. Dual-Opposite Injection Capillary Electrophoresis for Simultaneous Determination of Minerals and Aliphatic Organic Acids in Beer: Development, Validation, and Application. **Food Analytical Methods**, p. 1-11, 2022.

UZHEL, A. S. et al. Determination of full organic acid profiles in fruit juices and alcoholic beverages using novel chemically derivatized hyperbranched anion exchanger. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 95, p. 103674, 2021.

WALKER, R. P.; FAMIANI, F. Organic acids in fruits: metabolism, functions and contents. **Horticultural reviews**, v. 45, p. 371-430, 2018.

WHATLEY, H. Basic principles and modes of capillary electrophoresis. In: **Clinical and Forensic Applications of Capillary Electrophoresis**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 21-58, 2001.

WHITE, C; ZAINASHEFF, J. **Yeast: the practical guide to beer fermentation**. Brewers Publications, 2010.

WHITING, G. C. Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages—A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 82, n. 2, p. 84-92, 1976.

WINDES, S. et al. Comprehensive analysis of different contemporary barley genotypes enhances and expands the scope of barley contributions to beer flavor. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 79, n. 3, p. 281-305, 2021.

WU, Y. et al. Metabolic profiling of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) during fruit development and maturation. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1114, 2019.

XIANG, Y. et al. Factors influencing the organic acids content in final malt. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, vol. 64, no 4, p. 222-227, 2006.

XIE, F. et al. Metabolic Profiling of Sugars and Organic Acids, and Expression Analyses of Metabolism-Associated Genes in Two Yellow-Peel Pitaya Species. **Plants**, v. 11, n. 5, p. 694, 2022.

YEH, H. et al. Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts. **LWT-Food Science and Technology**, vol. 55, no 1, p. 329-334, 2014.

ZHANG, X. et al. Changes in the content of organic acids and expression analysis of citric acid accumulation-related genes during fruit development of yellow (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) and purple (*Passiflora edulis* f. *edulis*) passion fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, p. 5765, 2021.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782-2858, 2020.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Ácidos orgânicos alifáticos (mg L⁻¹) presentes nas diferentes etapas da produção artesanal do chope estilo Catharina Sour.

AOS	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7
Maleico	83,8 ± 4,33 ^a	63,4 ± 1,27 ^c	73,4 ± 1,58 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Malônico	1260 ± 68,99 ^c	1176 ± 13,47 ^c	1620 ± 5,24 ^a	1460 ± 22,88 ^b	1511 ± 58,87 ^{a,b}	1495 ± 51,93 ^{a,b}	1506 ± 60,63 ^{a,b}
Tartárico	51,8 ± 3,24 ^a	40,4 ± 1,13 ^{c,d}	46,7 ± 0,55 ^b	37,9 ± 0,02 ^d	39,3 ± 1,07 ^{c,d}	39,2 ± 1,21 ^{c,d}	42,6 ± 1,65 ^{b,c}
Fórmico	48,5 ± 0,90	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cítrico	280 ± 10,8 ^c	203,1 ± 0,35 ^d	328 ± 2,48 ^b	295 ± 3,19 ^c	284 ± 2,32 ^c	454 ± 14,2 ^a	467 ± 7,81 ^a
Málico	n.d.	n.d.	n.d.	114 ± 0,32 ^c	126 ± 4,14 ^c	482 ± 13,6 ^a	458 ± 3,47 ^b
Lático	56,9 ± 0,46 ^e	5475 ± 136,2 ^d	5903 ± 104,4 ^c	6272 ± 4,77 ^b	6248 ± 62,8 ^b	5978 ± 31,74 ^c	7527 ± 8,90 ^a
Glucônico	563,3 ± 30,1 ^a	n.d.	108,6 ± 6,36 ^b	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Succínico	215,5 ± 2,90 ^{a,b}	64,9 ± 0,99 ^d	145,5 ± 2,81 ^c	210 ± 1,08 ^b	209 ± 3,72 ^b	222 ± 3,37 ^a	222 ± 3,63 ^a
Acético	294,3 ± 17,2 ^f	763 ± 24,3 ^e	1259 ± 14,37 ^a	1140 ± 33,99 ^b	1067 ± 17,64 ^c	1109 ± 1,58 ^{b,c}	964 ± 17,5 ^d

Legenda: As concentrações foram expressas em média ± desvio padrão; ^{a-f} diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), pelo teste de *Tukey*. n.d. - não detectado. N1- mosto; N2- início da fermentação láctica; N3- final da fermentação láctica; N4- início da fermentação alcoólica; N5- final da fermentação alcoólica; N6- maturação; N7- chope de goiaba e pitaya.

Fonte: Próprio autor (2023).

APÊNDICE B - Ácidos orgânicos alifáticos (mg L⁻¹) presentes em amostras do processamento laboratorial da cerveja Catharina Sour.

AOA	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7
Malônico	979 ± 3,88 ^c	986,8 ± 16,09 ^c	754 ± 38,6 ^e	847,6 ± 16,03 ^d	935 ± 19,2 ^c	1188 ± 13,96 ^b	1296 ± 37,02 ^a
Tartárico	35,0 ± 1,93 ^b	39,2 ± 0,71 ^a	38,8 ± 0,67 ^a	33,9 ± 1,20 ^b	21,2 ± 0,58 ^c	n.d.	n.d.
Fórmico	105 ± 1,12	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Cítrico	474 ± 13,6 ^e	616 ± 33,4 ^d	623 ± 18,5 ^d	655 ± 29,3 ^d	1984 ± 37,40 ^a	1100 ± 12,22 ^c	1202 ± 30,91 ^b
Málico	119 ± 8,22 ^c	n.d.	49,5 ± 3,62 ^d	50,6 ± 2,07 ^d	653 ± 29,7 ^a	233 ± 5,66 ^b	260 ± 6,26 ^b
Lático	853 ± 30,6 ^e	5112 ± 5,940 ^{b,c}	5527 ± 120,6 ^{a,b}	5786 ± 229,4 ^a	4517 ± 219,3 ^d	4961 ± 105,9 ^c	5115 ± 120,9 ^{b,c}
Glucônico	62,2 ± 1,47 ^c	136 ± 5,94 ^b	n.d.	n.d.	151 ± 2,32 ^a	n.d.	n.d.
Succínico	n.d.	21,4 ± 0,84 ^c	109,6 ± 3,82 ^b	117 ± 5,67 ^b	116 ± 4,84 ^b	129 ± 1,91 ^a	116 ± 1,74 ^b
Acético	< LOQ	228 ± 7,22 ^a	< LOQ	73,6 ± 3,51 ^d	150 ± 0,56 ^b	109 ± 9,20 ^c	110 ± 3,60 ^c

Legenda: As concentrações foram expressas em média ± desvio padrão; ^{a-e} diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), pelo teste de *Tukey*. nd - não detectado. LOQ (1,61 mg L⁻¹) - Limite de quantificação do método. M1- mosto; M2- fermentação láctica; M3- fermentação alcoólica; M4- maturação pré-fruta; M5- chope de morango e maracujá; M6- chope de tangerina e M7- Chope de caju.

Fonte: Próprio autor (2023).

APÊNDICE C - Ácidos orgânicos alifáticos (mg L^{-1}) presentes em amostras comerciais da cerveja estilo Catharina Sour de duas cervejarias distintas (A e B).

AOS	A1	A2	B3	B4	B5
Maleico	68,8 ± 0,02 ^a	n.d.	50,4 ± 1,78 ^b	n.d.	n.d.
Malônico	1621 ± 25,33 ^a	1306 ± 31,45 ^b	1115 ± 12,25 ^d	1217 ± 24,44 ^c	1098 ± 9,070 ^d
Fumárico	n.d.	103 ± 2,78 ^a	58,9 ± 3,45 ^b	n.d.	n.d.
Tartárico	57,7 ± 1,25 ^a	37,3 ± 1,48 ^b	59,2 ± 0,51 ^a	38,7 ± 1,15 ^b	< LOQ
Fórmico	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52,0 ± 4,04
Cítrico	614 ± 18,4 ^a	480 ± 14,4 ^b	283 ± 9,79 ^c	583 ± 14,8 ^a	277 ± 13,2 ^c
Málico	167 ± 0,09 ^b	420 ± 18,7 ^a	98,1 ± 3,67 ^c	100 ± 2,56 ^c	77,6 ± 2,33 ^c
Lático	8083 ± 396,0 ^a	7178 ± 403 ^b	8573 ± 75,40 ^a	6352 ± 228,8 ^{b,c}	5826 ± 129,5 ^c
Succínico	164 ± 12,6 ^b	211 ± 8,07 ^a	181 ± 13,0 ^b	103 ± 5,46 ^c	90,5 ± 4,36 ^c
Acético	1286 ± 8,790 ^a	884 ± 68,1 ^b	568 ± 51,3 ^c	1209 ± 99,03 ^a	487 ± 4,36 ^c

Legenda: As concentrações foram expressas em média ± desvio padrão; ^{a-d} diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$), pelo teste de *Tukey*. n.d. - não detectado. LOQ - Limite de quantificação do método. A1- cerveja de abacaxi e hortelã; A2- cerveja de uva e gengibre; B3- cerveja de jabuticaba; B4 cerveja de framboesa; B5- cerveja de uva Goethe. Codificação das amostras com letras semelhantes dizem respeito à mesma cervejaria.

Fonte: Próprio autor (2023)